

**DENDRITISCHE ZELLEN IM PERIPHEREN BLUT BEI PATIENTEN MIT  
CHRONISCHER NIERENINSUFFIZIENZ**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Dipl. - Troph. Katharina Paul  
geboren am 27.03.1986 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Tilmann Grune, Potsdam
2. Prof. Dr. Gunter Wolf, Jena
3. Prof. Dr. Matthias Girndt, Halle

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.12.2015

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
APC	Antigen-präsentierende Zellen
BDCA	Blood dendritic cell antigen
CBA	Immunassay zur Detektion von Zytokinen (cytometric bead array)
CKD	Chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease)
CRP	C-reaktives Protein
CV	Kardiovaskulär
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung (cardiovascular disease)
CVE	Kardiovaskuläres Ereignis (cardiovascular event)
DC	Dendritische Zelle/ dendritische Zellen
DCP	Dendritische Vorläuferzellen (dendritic cell precursors)
eGFR	Geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (estimated GFR)
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FLT3	fms-like tyrosine kinase 3
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HDL	Lipoprotein hoher Dichte (high-density lipoprotein)
hsCRP	Hochsensitives C-reaktives Protein
IL	Interleukin
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte (low-density lipoprotein)
mDC	Myeloide dendritische Zelle/ myeloide dendritische Zellen
mDCP	Myeloide dendritische Vorläuferzelle
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
NSB	Nicht-spezifische Bindung
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle/ plasmazytoide dendritische Zellen
pDCP	Plasmazytoide dendritische Vorläuferzelle
RAS	Renin-Angiotensin-System
SSC	Seitwärtsstreulicht (side scatter)
tDC	Gesamt-dendritische-Zellen (total dendritic cells)
tDCP	Gesamt-dendritische-Prekursorzellen (total dendritic cell precursors)

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
VDR	Vitamin D-Rezeptor
WBC	Anzahl weißer Blutkörperchen (White blood cell count)

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	1
2. Einleitung.....	3
2.1    Dendritische Zellen im humanen Immunsystem .....	3
2.2    Chronische Niereninsuffizienz .....	6
2.2.1    Inflammation, Atherosklerose und erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei chronischer Niereninsuffizienz .....	8
2.2.2    Beziehung zwischen Vitamin D und chronischer Niereninsuffizienz .....	12
3. Ziele der Arbeit .....	16
4. Methodik .....	18
4.1    Patienten und Untersuchungen .....	18
4.1.1    Auswahl der Patienten und Kontrollpersonen .....	18
4.1.2    Datenerhebung und körperliche Untersuchung.....	20
4.2    Methoden .....	21
4.2.1    Durchflusszytometrie .....	21
4.2.2    Enumeration der zirkulierenden dendritischen Präkursorzellen .....	22
4.2.3    Cytometric Bead Array – Messung von Zytokinen .....	25
4.2.4    25(OH)-Vitamin D-Messung.....	28
4.2.5    1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D-Messung .....	30
4.2.6    Datenverarbeitung und statistische Auswertung .....	32
5. Ergebnisse.....	34
5.1    Stabilität bzw. Überlebensrate der zirkulierenden dendritischen Präkursorzellen nach Blutabnahme.....	34
5.2    Klinische Daten der chronisch niereninsuffizienten Patienten im Stadium 3 und der Kontrollen .....	34
5.3    Zirkulierende dendritische Präkursorzellzahl bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3 .....	38

---

5.4	Zirkulierende dendritische Präkursorzellen und glomeruläre Filtrationsrate bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3 .....	43
5.5	C-reaktives Protein, Anzahl zirkulierender dendritischer Präkursorzellen und glomeruläre Filtrationsrate bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3 .....	43
5.6	Zytokinkonzentrationen im Plasma bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3 .....	45
5.7	Vitamin D-Status und DCP-Zahl bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3 .....	46
6.	Diskussion .....	51
6.1	Chronische Niereninsuffizienz, kardiovaskuläres Risiko und Atherosklerose.....	51
6.2	Zirkulierende dendritische Präkursorzellzahl bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3 .....	53
6.3	Zirkulierende dendritische Zellen und Nierenfunktion.....	57
6.4	Zirkulierende dendritische Zellen und Inflammation .....	58
6.5	Chronische Niereninsuffizienz, Inflammation und Zytokine .....	60
6.6	Chronische Niereninsuffizienz und Vitamin D.....	63
7.	Schlussfolgerung .....	69
8.	Literatur- und Quellenverzeichnis .....	71
9.	Anhang .....	89

## 1. Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind bedeutende Antigen (AG)-präsentierende Zellen (APC) im Immunsystem, wo sie eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der angeborenen und erworbenen Immunität spielen. Sie zirkulieren im Blut als Vorläuferzellen, so genannte dendritic cell precursors (DCP). Als DC haben sie als ortsständige Zellen in diversen Geweben die Aufgabe fremde bzw. gefährliche Stoffe zu erkennen, zu prozessieren und als APC zu präsentieren. Es gibt 2 verschiedene Subpopulationen: die myeloiden (mDC) und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC).

Eine Reduktion der zirkulierenden DCP steht in Beziehung zu atherosklerotischen Erkrankungen. Da chronische Niereninsuffizienz (CKD) mit chronischer Inflammation und erhöhtem kardiovaskulären (CV) Risiko assoziiert ist, könnte die Reduktion der DCP zudem eine wichtige Rolle für die Erhöhung des CV Risikos bei CKD spielen. Dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung relative und absolute Zellzahlen von zirkulierenden mDCP, pDCP und Gesamt-DCP (tDCP) bei 287 Patienten mit CKD im Stadium 3 mittels Durchflusszytometrie bestimmt und die Ergebnisse mit denen einer koronar und renal relativ gesunden Kontrollgruppe (n=85) verglichen. Weiterhin wurde die Plasmakonzentration wichtiger Entzündungsmarker wie C-reaktives Protein (CRP), Interleukin (IL)-6, IL-10 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), sowie der Vitamin D-Status evaluiert. Ein Mangel an Vitamin D oder ein gestörter Vitamin D-Metabolismus könnte eine Ursache für die Reduktion zirkulierender DCP darstellen. Sollte sich also ein Zusammenhang zwischen Vitamin D-Stoffwechsel und DCP erhärten lassen, könnte dies einen pathophysiologischen Link zwischen dem Vitamin D-Stoffwechsel und Atheroskleroseentwicklung bei CKD begründen.

Die Ergebnisse belegen eine signifikante Reduktion der DCP bereits bei einer CKD im Stadium 3 im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten (jeweils  $p < 0.001$ ). Des Weiteren weisen CKD-Patienten im Stadium 3 bereits niedrigere DCP-Zahlen auf als Patienten mit gesicherter koronarer Herzkrankheit (KHK) jeglicher Schweregrade jedoch ohne moderate oder schwere Niereninsuffizienz. Bei früheren Untersuchungen konnte eine Schweregrad-abhängige Abnahme der peripheren

DCP-Zahl bei KHK beobachtet werden. Die signifikante Reduktion von mDCP und tDCP bei CKD 3-Patienten im Vergleich zu Patienten mit schwerer KHK könnte somit auf eine DC vermittelte CV Risikoerhöhung bei CKD-Patienten hindeuten. Die Untersuchung von CKD 3-Patienten mit vorbekannten kardiovaskulären Ereignissen (CVE) wiesen zudem tendenziell niedrigere DCP-Zahlen als CKD-Patienten ohne bisherige CVE auf. Weiterhin ergab sich bei den Kontrollen und CKD-Patienten eine signifikant positive Korrelation zwischen der geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) und den DCP-Zahlen ( $r=0.262$ ,  $p<0.001$  für mDCP;  $r=0.296$ ,  $p<0.001$  für pDCP;  $r=0.314$ ,  $p<0.001$  für tDCP). Der Rückgang der Nierenfunktion ist demnach mit dem der DCP-Zahl assoziiert. CKD 3-Patienten mit niedrigen mDCP- ( $p<0.001$ ) und tDCP-Zahlen ( $p=0.002$ ), bzw. niedriger eGFR ( $p=0.018$ ) wiesen zudem höhere CRP-Werte auf, was dafür spricht, dass Inflammation und DCP-Zahl assoziiert sind. Erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmarkern wurden bei CKD-Patienten bereits seit langem nachgewiesen. DC besitzen eine hohe Kapazität für die Bildung inflammatorischer Zytokine. In unserer Untersuchung konnte jedoch keine Beziehung zwischen den DCP-Zahlen und den Plasma-Zytokin-Konzentrationen nachgewiesen werden. Die CKD 3-Patienten wiesen eine deutliche 25(OH)-Vitamin D-Insuffizienz auf, die 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Plasmakonzentrationen befanden sich im Normbereich. Niedrige 25(OH)-Vitamin D-Konzentrationen bei CKD-Patienten im Stadium 3 bis 5 sind mit erhöhtem Risiko für Gesamtmortalität und CV-Mortalität assoziiert. Bei den untersuchten Patienten wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen fallender eGFR und erniedrigter 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Plasmakonzentration nachgewiesen ( $r=0.201$ ,  $p=0.006$ ). Weiterhin konnten erhöhte CRP-Konzentrationen bei erniedrigtem 25(OH)-Vitamin D- bzw. 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D- Spiegel detektiert werden ( $r=-0.188$ ,  $p=0.002$  bzw.  $r=-0.157$ ,  $p=0.033$ ). Inwieweit die erniedrigten DCP-Zahlen im peripheren Blut bei den CKD 3-Patienten vom Ausmaß bislang stummer atherosklerotischer Veränderungen abhängen oder Ausdruck einer chronischen Gefäßinflammation bei Urämie sind und damit das CV Risiko determinieren, bleibt eine offene Frage. Die Analyse der DCP könnte für die Abschätzung des CV Risikos und der Entwicklung von Atherosklerose von CKD-Patienten nützlich sein. Ein Zusammenhang zwischen DCP, dem Vitamin D-Status, etwaiger Vitamin D-Medikation bzw. der Zytokinkonzentration ließ sich jedoch nicht erhärten.



## 2. Einleitung

### 2.1 *Dendritische Zellen im humanen Immunsystem*

Dendritische Zellen (DC) wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben (Steinman und Cohen 1973). Im humanen System spielen sie eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der angeborenen und erworbenen Immunität. Als wichtige Antigen (AG)-präsentierende Zellen leiten diese Zellen eine effektive und spezifische Immunantwort ein. Man findet sie in fast allen Körpergeweben, wo sie ein dichtes Netzwerk bilden (Branchereau et al. 2000) und weniger als ein Prozent der mononukleären Zellen ausmachen (Sato und Fujita 2007). Sie zirkulieren im Blut als Vorläuferzellen, so genannte dendritic cell precursors (DCP), zu ihrem jeweiligen Zielgewebe, wo sie zu unreifen DC differenzieren. Sie gelten als ortsständige Gewebsmakrophagen, erkennen fremde bzw. gefährliche Stoffe, prozessieren und präsentieren diese als Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex, major histocompatibility complex)-Kontext. Antigene Determinanten pathogener Peptide werden somit für T-Lymphozyten erkennbar gemacht. Bei der Detektion von Pathogenen werden unreife DC aktiviert, verlassen das periphere Gewebe und wandern mit der drainierenden Lymphe in den regionalen Lymphknoten, wo sie eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit T-Zellen spielen (West et al. 2004).

Die Aktivierung der DC ist ein komplexer Prozess, der verschiedene Stadien einschließt. In Abhängigkeit ihres Aktivierungsgrades induzieren DC Toleranz gegenüber der präsentierten AG oder initiieren eine spezifische T-Zell-Immunantwort (Finkelman et al. 1996). Welche Mustererkennungsrezeptoren der DC durch den AG-Kontakt aktiviert werden, entscheidet über die Freisetzung der Zytokine. Die Stärke der Aktivierung wird durch diese verschiedenen Signale fein reguliert (Mellman und Steinman 2001).

Abbildung 1 verdeutlicht schematisch die verschiedenen Funktionszustände, die eine DC durchläuft (Takeda et al. 2012). Im unreifen, nicht aktivierten Stadium exprimieren DC lediglich geringe Mengen an MHC-Klasse-I-, MHC-Klasse-II- und kostimulatorischen Molekülen (Steinman 2007, Sato und Fujita 2007). Eine T-Zell-Toleranz wird dabei durch Anergie, Zerstörung oder Induktion von regulatorischen T-

Zellen induziert (Mellman und Steinman 2001). Dass die von den DC induzierte Immunantwort nicht außer Kontrolle gerät, geschieht unter anderem mit Hilfe der nicht-aktivierten DC (Stockwin 2000).

Bei Kontakt mit bestimmten AG, die „Gefahr“ signalisieren oder inflammatorisch wirkenden Zytokinen und Chemokinen werden DC zur Reifung stimuliert (Sato und Fujita 2007). Während dieses Prozesses erhöhen DC die Expressionsrate von MHC und kostimulierenden Molekülen (z.B. CD40, CD80, CD86) und beginnen proinflammatorische und antivirale Zytokine zu sezernieren, die wiederum zur Aktivierung naiver T-Zellen führen (Sato und Fujita 2007). Die Induktion einer adaptiven Immunantwort wird also erst dadurch erreicht, dass T-Zellen ihr spezifisches AG auf den DC im MHC-Kontext erkennen und durch weitere kostimulatorische Oberflächenmoleküle der DC aktiviert werden (Stockwin et al. 2000). Fehlt dieses Signal werden die T-Zellen antagenspezifisch im Sinne einer Anergie oder Toleranz supprimiert. Zusätzlich können reife DC natürliche Killerzellen und natürliche Killer-T-Zellen aktivieren, welche in die Peripherie ausschwärmen und ihre Funktion als T-Helferzellen oder zytotoxische T-Zellen entfalten können (Mellman und Steinman, 2001).

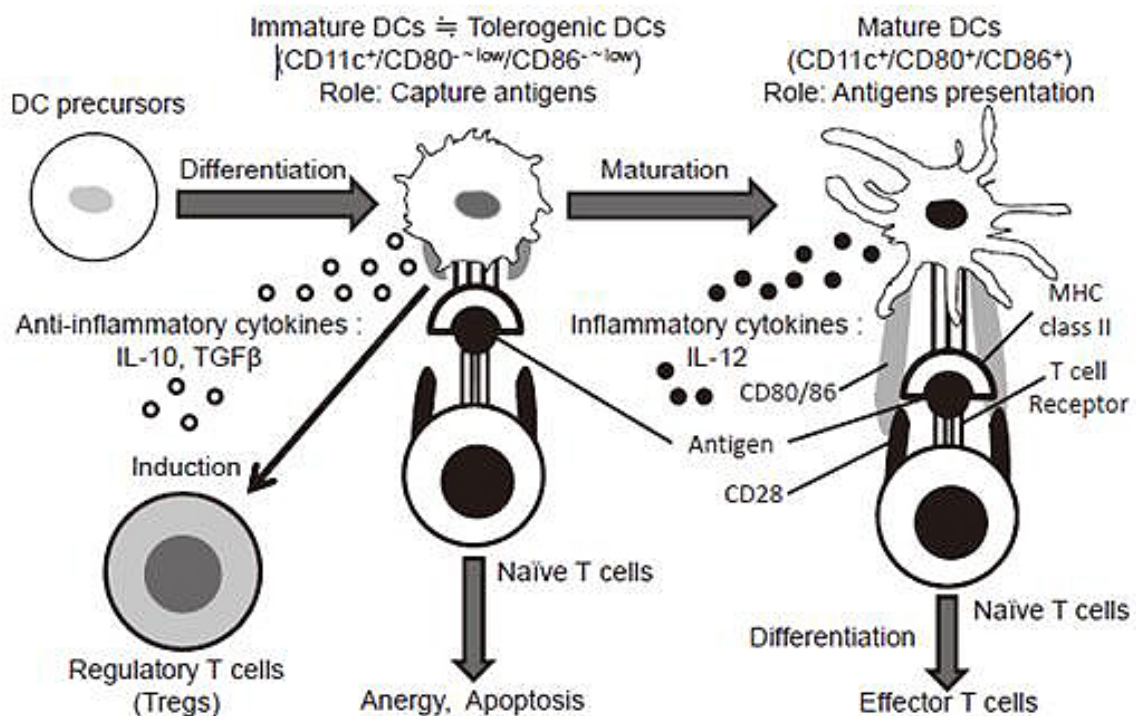


Abbildung 1 Funktionszustände einer dendritischen Zelle (nach Takeda et al. 2012)

DC stellen daher eine heterogene Population dar, da sie sich in Ursprung und Stadien der Differenzierung unterscheiden und spezifische Funktionen und migratorische Profile besitzen (Branchereau et al. 2000, Liu 2001). Im menschlichen Körper können zumindest mittels der Expression von spezifischen Oberflächenmarkern zwei Subtypen von DC unterschieden werden: (1) myeloide DC (mDC), welche die Oberflächenmarker CD11c, CD11b und CD33 exprimieren, IL-12 in Folge einer Stimulation sezernieren und gewöhnlich nach Kontakt mit bakteriellen Produkten aktiviert werden; und (2) plasmazytoide DC (pDC), welche morphologisch den Plasmazellen ähneln, CD123 exprimieren, auf virale Infektionen antworten und für die Produktion von Interferon alpha verantwortlich sind (Sato und Fujita 2007).

mDC unterscheiden sich in „steady state“-DC, welche kontinuierlich die Umgebung abtasten, und in „inflammatorische“ DC, welche als Antwort auf eine Inflammation generiert werden (Shortman and Naik, 2007). Sie spielen zudem eine wichtige Rolle bei verschiedenen Effektor-T-Zellantworten. Sie bestehen aus 2 Untergruppen: (1) die häufiger vorkommenden mDC-1, welche T-Zellen stimulieren und (2) die extrem seltenen mDC-2, welche Funktionen bei Wundinfektionen haben.

pDC sind Hauptmediatoren antiviraler Immunität, mit der Fähigkeit hohe Konzentrationen von Typ-I-Interferonen als Antwort auf virale Infektionen zu produzieren. Sie können die Differenzierung von IL-10-produzierenden regulatorischen T-Zellen vorantreiben und spielen damit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung einer peripheren Toleranz (Agrawal et al. 2010).

DC sind somit unabdingbare Komponenten des Immunsystems. Sie sind an vielen pathophysiologischen Abläufen beteiligt und können daher als potentielle therapeutische Ziele für die Behandlung diverser Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder allergischen Reaktionen betrachtet werden.

Enumerationsstudien haben gezeigt, dass die DC-Zahl bei verschiedenen klinischen Gegebenheiten wie z.B. Autoimmunerkrankungen, Arthritis, koronare Herzkrankheit (KHK) und Krebs signifikant verändert ist (Chowdhury et al. 2010). Die herausragende Position der DC im humanen Immunsystem hat sie daher zum Ziel intensiver Forschung gemacht, um ihre Rolle bei verschiedenen Krankheiten zu verstehen und um Optionen zu finden, ihre Aktivität zu verändern.

## 2.2 Chronische Niereninsuffizienz

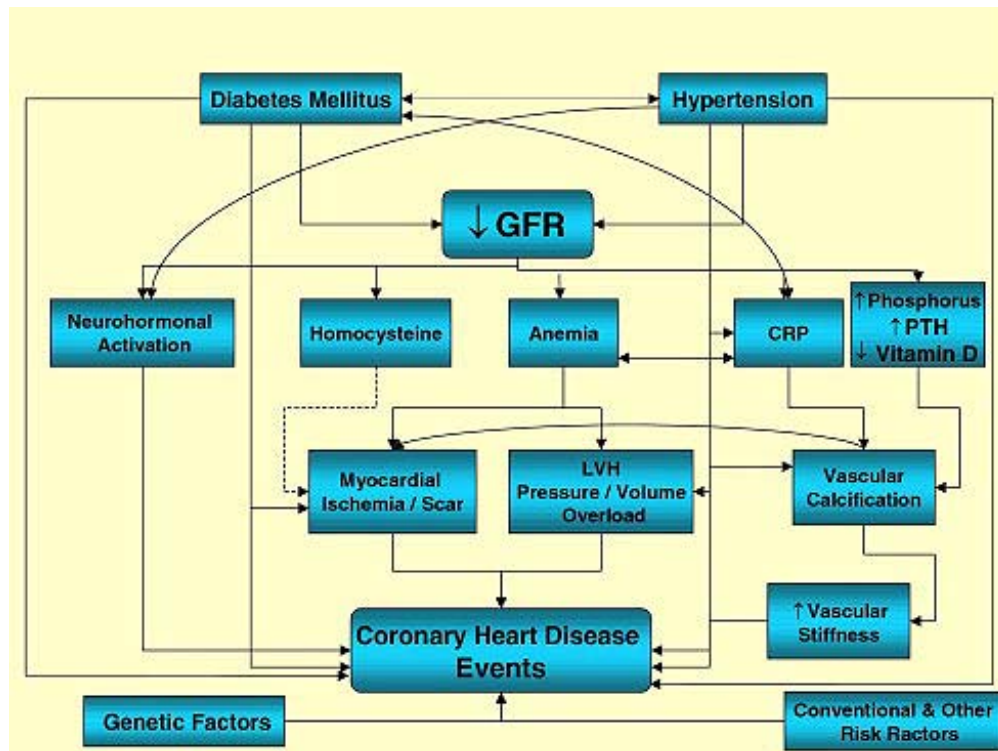
Eine chronische Niereninsuffizienz (chronic kidney disease, CKD) ist nach klassischer Definition durch eine Verminderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR)  $<60$  ml/ min für drei Monate oder länger, unabhängig von der Ursache oder dem Vorliegen eines Nierenschadens gekennzeichnet (National Kidney Foundation 2002, Gansevoort et al. 2013). Sekundäre Nierenerkrankungen wie die diabetische oder hypertensive Nephropathie sind die Hauptursachen einer CKD. Ferner können diverse glomeruläre und tubulointerstitielle Erkrankungen, sowie vaskuläre Nephropathien oder hereditäre Nierenerkrankungen für den renalen Funktionsverlust verantwortlich sein (Schober-Halstenberg 2007). Der progressive Verlust der Nierenfunktion führt zu einer verminderten Clearance von Stoffwechselprodukten und somit zu einem Anstieg der Konzentration diverser Stoffe im Blut. Durch die verminderte Regulationsfähigkeit der Niere sind zudem die Wasser- und Elektrolytausscheidung und der Säure-Basen-Haushalt gestört (Levey und Coresh 2012). Der Grad der Nierenfunktion bestimmt das Stadium der Nierenerkrankung. Eine CKD im Stadium 3 schließt Patienten mit einer GFR von 30 bis 60 ml/ min/  $1.73\text{m}^2$  Körperoberfläche ein (Abbildung 2, National Kidney Foundation 2013).

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				$<30$ mg/g $<3$ mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	$>300$ mg/g $>30$ mg/mmol
GFR categories (ml/min/ $1.73\text{m}^2$ ) Description and range	G1	Normal or high	$\geq 90$			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	$<15$			

**Abbildung 2** Stadien und Prognose für eine chronische Nierenerkrankung nach der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Albuminausscheidung (Grün: Niedriges Risiko – bei fehlenden anderen Markern für eine Nierenerkrankung, Gelb: Moderat erhöhtes Risiko, Orange: Hohes Risiko, Rot: Sehr hohes Risiko; National Kidney Foundation 2013).

Die Diagnose einer CKD wird immer häufiger gestellt, zum einen durch die weit verbreitete Einführung der Untersuchung der GFR, zum anderen als Ergebnis der immer älter werdenden Bevölkerung mit einer erhöhten Prävalenz von Bluthochdruck und Diabetes. Nach dem Report der Gesellschaft Qualitäts-Sicherung Niere konnte in Deutschland von 1997 bis 2006 ein Anstieg der Inzidenz von 5,1 % verzeichnet werden (Schober-Halstenberg 2007). Patienten mit CKD besitzen ein hohes Risiko für die Progression des Nierenfunktionsverlusts bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz oder ein akutes Nierenversagen. Die terminale Niereninsuffizienz (ESRD, end stage renal disease) führt zur Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie in Form einer Dialysebehandlung oder Nierentransplantation.

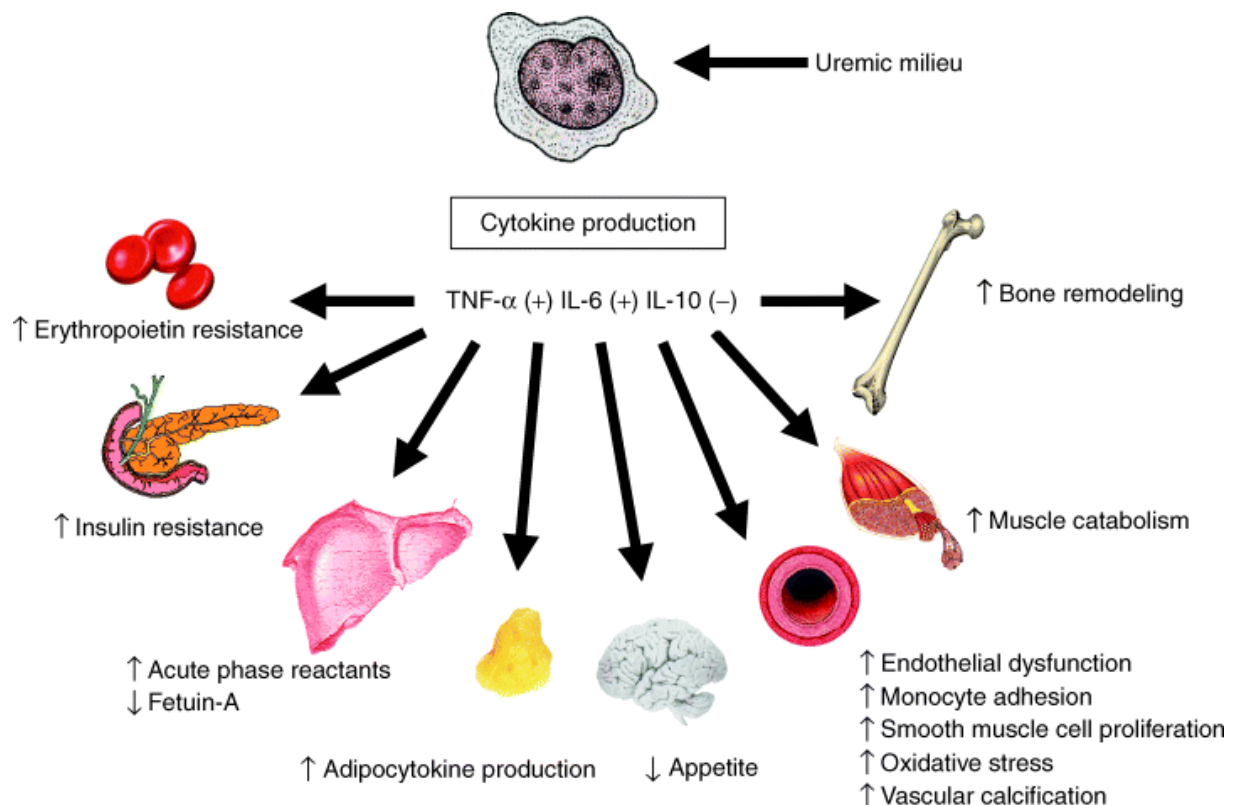
Mit fallender GFR steigt das CV-Risiko exponentiell an (Go et al. 2004). Sofern Patienten das Stadium der ESRD erreichen und mit der Dialyse beginnen, weisen sie bereits ein alarmierend hohes Risiko für CV bedingte Mortalität auf. Der CV Status von Patienten in früheren Stadien der CKD gewinnt somit zunehmend an therapeutischer Bedeutung. Insofern gewinnt die CV Prävention an Bedeutung. Viele CKD Patienten leiden weder an den Symptomen der Urämie, noch sterben sie an der Nierenerkrankung, sie erliegen CVE bevor sie eine Ersatztherapie benötigen (Wright und Hutchison, 2009). CKD verschlechtert darüber hinaus die Prognose weiterer Erkrankungen z. B. von Infektionserkrankungen (Gansevoort et al. 2013). In Abbildung 3 sind Beziehungen zwischen CKD und CVE dargestellt.



**Abbildung 3 Die Beziehung zwischen chronischer Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Ereignissen (nach Hage et al. 2009)**

### 2.2.1 Inflammation, Atherosklerose und erhöhtes kardiovaskuläres Risiko bei chronischer Niereninsuffizienz

Die Wechselwirkung zwischen Nierenfunktionsstörung und Herzkreislaufsystem scheint unter anderem durch das Immunsystem, welches den urämischen Zustand bei CKD als kontinuierlichen Angriff auf Zellen und Gewebe bewertet, vermittelt zu werden. Da Urämietoxine proinflammatorische Wirkungen aufweisen, übt deren Anreicherung einen fortwährenden Entzündungsreiz aus. Somit können erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmediatoren in frühen Stadien der CKD nachgewiesen werden, die sich mit dem Fortschreiten der Nierenerkrankung weiter erhöhen. Die Urämie gilt als Zustand chronischer Inflammation. Gefäßveränderungen in Folge atherosklerotischer Prozesse werden durch die Interaktion von Immunzellen mit Zellen der Gefäßwand bei Patienten mit CKD initiiert und aufrechterhalten (Abbildung 4, Stinghen et al. 2010).



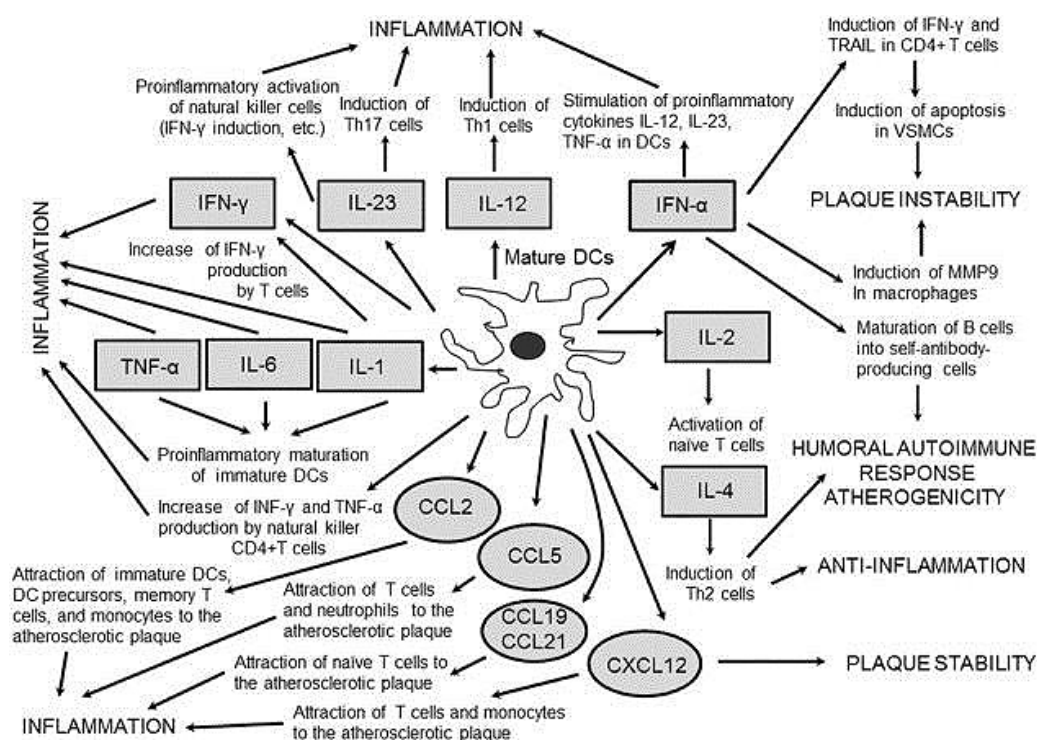
**Abbildung 4 Folgen der Inflammation (nach Stenvinkel et al. 2005)**

Atherosklerose ist ein lokaler, hochkomplexer, aktiver Prozess und wesentlich durch eine inflammatorische Reaktion in der Gefäßwand charakterisiert (Niessner et al. 2010). Bereits in der Frühphase der Atherosklerose, im Stadium der endothelialen Dysfunktion, kommt es, vermittelt durch Adhäsionsmoleküle, zum Anhaften bestimmter Butzellen wie Monozyten an das Endothel. Im weiteren Verlauf dringen diese Zellen in den subintimalen Raum und es kommt zur Umbildung in Monozyten bzw. Makrophagen. Nach Lipidbeladung entstehen Schaumzellen, die für atherosklerotische Plaques charakteristisch sind (Ross 1999).

Bei inflammatorischen Erkrankungen wie der Atherosklerose, die mit einer systemischen, geringgradigen inflammatorischen Antwort einhergehen, haben immunkompetente Zellen wie DC eine pathophysiologische Bedeutung. Das Vorhandensein von DC in Wänden der Aorta wurde zum ersten Mal im Jahr 1995 beschrieben (Bobbryshev und Lord 1995). Während der Atherogenese erhöht sich die Anzahl der DC in der Gefäßwand und in atherosklerotischen Plaques (Mantovani et al. 2009, Galkina et al. 2006). Eine Ursache für diese Erhöhung könnte die direkte Rekrutierung der DC aus der Zirkulation durch eine von Endothelzellen und Immunzellen induzierte Freisetzung von spezifischen Chemokinen in der aortalen



Wand sein (Zernecke et al. 2008). Zusätzlich zur DC-Rekrutierung trägt eine lokale DC-Proliferation zur Erhöhung der DC-Zahl in der Gefäßwand bei (Zhu et al. 2009). DC tragen weiterhin zur Progression der Atherosklerose bei, indem sie atherosklerosespezifische AG aufnehmen, dadurch lokal aktiviert werden und zu den regionalen Lymphknoten migrieren, um T-Zellen zu aktivieren. Im Verlauf der Atherogenese akkumulieren aktivierte DC in den Plaques, interagieren dort lokal mit T-Zellen und bewirken die T-Zell-Aktivierung in der Gefäßwand. Diese Mechanismen führen zu erhöhter lokaler Inflammation und zum Wachstum der atherosklerotischen Plaques (Llodra et al. 2004). DC besitzen zudem eine hohe Kapazität um proinflammatorische und proatherogene Zytokine, wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-6, IL-12, und Chemokine, die zur weiteren Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten in Plaques beitragen können, zu bilden (Abbildung 5, Brånén et al. 2004). Durch die Erhöhung der Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren im Verlauf des systemisch inflammatorischen Zustands, werden weitere DC rekrutiert und verstärken damit die zugrunde liegende Inflammation (Agrawal et al. 2010). Plaqueformation und Plaqueruptur sind mit CV Endpunkten assoziiert (Herzog et al. 2011).



**Abbildung 5** Zytokine und Chemokine, die von reifen dendritischen Zellen in atherosklerotischen Gefäßen gebildet werden (nach Chistiakov et al. 2014)



In einer Reihe prospektiver Studien wurde gezeigt, dass bereits leicht erhöhte Konzentrationen systemischer inflammatorischer Marker bei gesunden Personen, aber auch bei Patienten mit manifester Atherosklerose starke Prädiktoren für CVE darstellen. Erhöhte Plasmakonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen (besonders IL-6) und von CRP sind bekannte Risikoprädiktoren für CV Morbidität und Mortalität in urämischen Patienten (Himmelfarb et al. 2009). Die Mortalitätsrate für Patienten mit fortgeschrittener Nierenerkrankung und für Patienten mit ESRD ist signifikant höher im Vergleich zu gesunden Kontrollen. CVE sind die führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in dieser Patientengruppe und tragen bei 50 % der Patienten zu einem verfrühten Tod bei. Sowohl Kinder als auch junge Erwachsene mit fortgeschrittener CKD und ESRD haben ein 30fach erhöhtes CV bedingtes Mortalitätsrisiko im Vergleich zu altersgematchten Kontrollen. Die progrediente und chronisch anhaltende CKD ist durch zunehmende Atherogenese, die Entwicklung intimaler Hyperplasien und vaskuläre Kalzifizierung charakterisiert (Himmelfarb et al. 2009). CKD gilt somit als starker und unabhängiger Risikofaktor für CVE und Komplikationen (Herzog et al. 2011).

Da es zur Anreicherung von DC im atherosklerotischen Plaque kommt, könnte die periphere Reduktion der zirkulierenden DCP ein indirekter Indikator für atherosklerotische Gefäßveränderungen sein. Signifikante Reduktionen der peripheren DCP-Zahlen wurden bereits schweregradabhängig bei Patienten mit stabiler KHK, bei Angina pectoris sowie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt nachgewiesen (Yilmaz et al. 2009, Kretzschmar et al. 2012). Eine vergleichbar signifikante Reduktion der zirkulierenden DCP konnte bereits bei Hämodialysepatienten gezeigt werden (Lim et al. 2007).

Die periphere DC-Zahl könnte somit als neuer Biomarker für immunologische Prozesse in atherosklerotischen Plaques bei CKD herangezogen werden und Auskunft über die vaskuläre Inflammation geben. Weiterhin könnte ein schlechter Immunstatus zu proatherosklerotischen Mechanismen beitragen (Hansson 2005). Der chronisch-entzündliche Zustand bei CKD kann zu einer geringeren Anzahl von zirkulierenden Immunmarkern wie der DCP-Zahl führen. Bisher wurden kaum fundierte Untersuchungen über die Anzahl der DCP bei Patienten mit CKD in früheren CKD-Stadien angestrebt.

### 2.2.2 Beziehung zwischen Vitamin D und chronischer Niereninsuffizienz

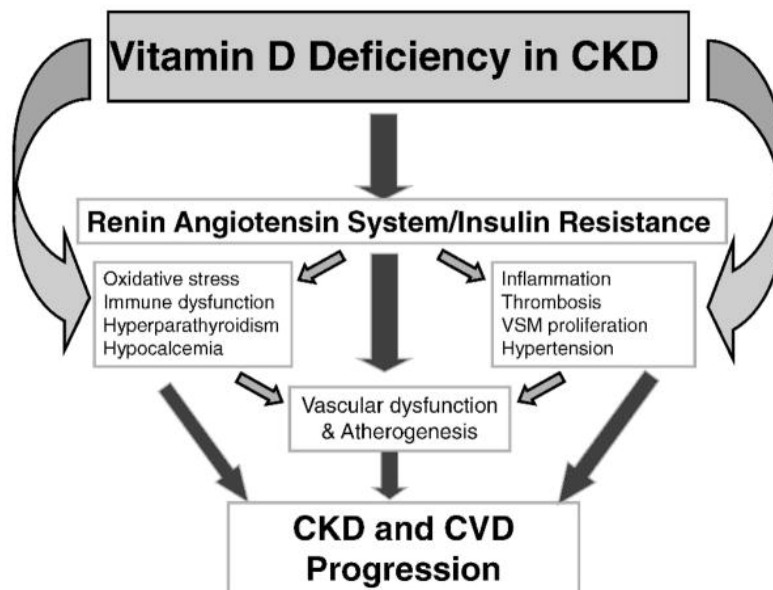
Vitamin D wird endogen durch UVB-Lichteinstrahlung über die Haut gebildet oder mit der Nahrung aufgenommen. 7-Dehydrocholesterol wird dabei zunächst zu Prävitamin D<sub>3</sub> und durch thermische Isomerisierung weiter in Vitamin D<sub>3</sub> umgewandelt. Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> (Aufnahme über die Nahrung) gelangen ins Blut und werden dort vor allem an das Vitamin-D-bindende Protein gebunden zur Leber transportiert, wo sie weiter zu 25(OH)-Vitamin D hydroxyliert werden, welches dem Vitamin D-Speicher des Körpers entspricht und Auskunft über die mittel- und langfristige Vitamin D-Versorgung des Menschen gibt. Die Aktivierung in das 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D, mit Hilfe der 1- $\alpha$ -Hydroxylase, findet anschließend in der Niere statt. 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D stellt die aktive Form von Vitamin D dar und generiert die physiologischen Effekte (DeLuce 2004). Durch die kurze Halbwertszeit und dadurch, dass sich die Konzentrationen von Kalzium, Phosphat, Parathormon und Fibroblast Growth Factor (FGF)-23 auf das 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Level auswirken, ist die 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Konzentration für die Bewertung des Vitamin D-Status ungeeignet.

Zusätzlich zur klassischen Aktivierung wurden 1 $\alpha$ -Hydroxylase und der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) in diversen Immunzellen nachgewiesen, welche damit die Fähigkeit zur Konversion von 25(OH)-Vitamin D zu 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D besitzen, das autokrin sezerniert wird (Heaney 2008). Im Immunsystem erfolgt somit eine Immunmodulation, die zu einer Verstärkung der angeborenen Immunität sowie einer vielfältigen Regulation der erworbenen Immunantwort führt. Durch die Bindung an den intrazellulären VDR ist 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D in der Lage Zellproliferation und Zelldifferenzierung, Entzündungsreaktionen, das Immunsystem und das endokrine System zu regulieren, was sich direkt auf das Renin-Angiotensin-System (RAS), Insulinresistenz und den Fettstoffwechsel auswirkt. Vitamin D-Mangel wird daher mit der Entwicklung diverser chronischer Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck, kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) und CKD in Verbindung gebracht (Jones 2007, Holick 2007). Eine unzureichende Vitamin D-Versorgung ist in der Gesamtbevölkerung weit verbreitet (Heaney 2008). Patienten mit CKD sind jedoch weitaus stärker davon betroffen (Jones 2007). Eine Vielzahl an Studien

konnte längst eine hohe Prävalenz von Vitamin D-Defizienz bei CKD-Patienten nachweisen (Echida et al. 2012).

Es gibt viele Gründe für die hohe Prävalenz an Vitamin D-Defizienz in CKD. Eine reduzierte Aufnahme über die Nahrung in Folge einer Diät in Verbindung mit der Zufuhr kalziumreicher Lebensmittel stellt eine Ursache dar. Zudem ist es Patienten mit chronischen Erkrankungen meist nicht möglich, sich ausreichend der Sonneneinstrahlung auszusetzen. Patienten mit CKD sind darüber hinaus nur vermindert in der Lage, in der Haut Vitamin D<sub>3</sub> aus Prävitamin D<sub>3</sub> herzustellen. Weiterhin hat Proteinurie in CKD durch den vermehrten Verlust von Vitamin D-Metaboliten und dem Vitamin D-bindenden Protein ein Vitamin D-Defizit zur Folge (Levin et al. 2007). Eine kalziumarme Diät führt durch einen Anstieg der PTH-Konzentration und dem damit einhergehenden Abbau von 25(OH)-Vitamin D zu inaktiven Metaboliten ebenfalls zu einem erniedrigten 25(OH)-Vitamin D-Level (Levin et al. 2007). Ein Defizit von 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D entsteht durch den Verlust der Fähigkeit 25(OH)-Vitamin D in 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D zu konvertieren (Holick 2007). Dies ist mit progredienter Niereninsuffizienz der Fall. Darüber hinaus ist die biologische Aktivität von 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D bei CKD vermindert. Das urämische Milieu wirkt sich negativ auf die Bindung des VDR an spezifische DNA-Abschnitte aus (Valdivielso 2009).

Zusätzlich zu den klassischen Funktionen von Vitamin D, wie der Regulierung des Calcium-Phosphat-Haushalts, sind die nicht-klassischen Funktionen für das erhöhte Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko bei CKD-Patienten von Bedeutung. Vitamin D-Analoga können Einfluss auf Proteinurie, Blutdruck und Entzündungsreaktionen nehmen und damit das Fortschreiten der renalen Funktionsstörungen beeinflussen (Abbildung 6, Zhang et al. 2007).

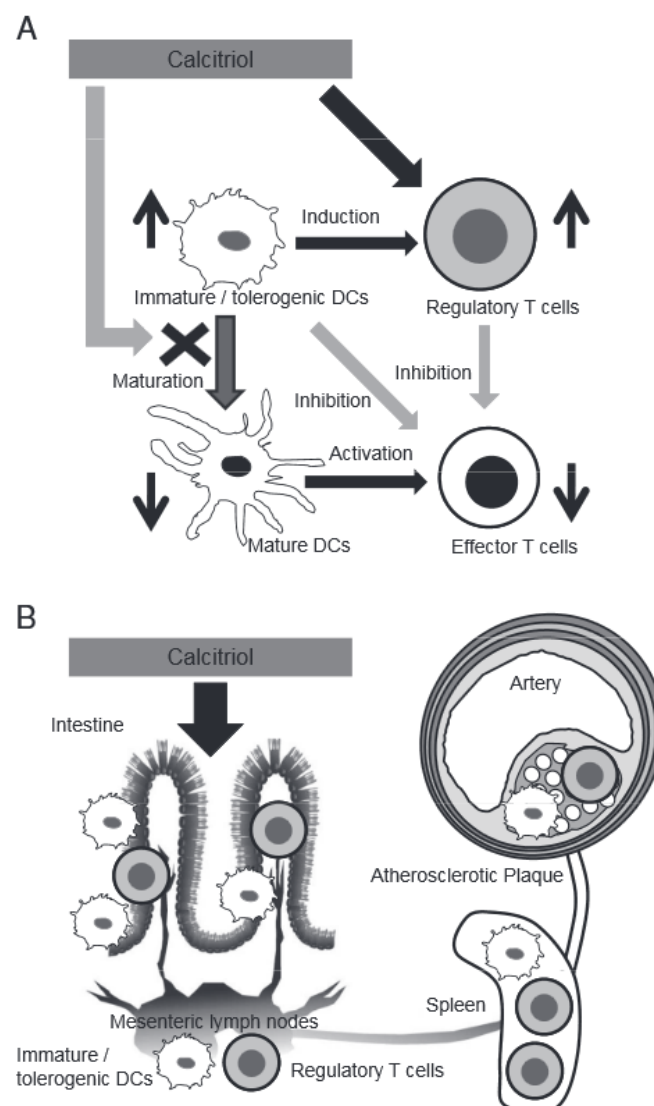


**Abbildung 6 Vitamin D-Defizit bei chronischer Niereninsuffizienz (nach Zhang et al. 2007)**

Vitamin D-Mangel ist mit erhöhter Mortalität bei CKD assoziiert (Artaza et al. 2009). Vitamin D-Mangel und auch Hyperglykämie, welche bei der führenden CKD-Grunderkrankung - der diabetischen Nephropathie - vorkommen, sind mit einer Aktivierung des RAS assoziiert. Die Aktivierung von Angiotensin II löst eine Erhöhung des Blutdrucks aus, was wiederum zu parenchymalen renalen Schäden führt und damit die Progression der Nierenerkrankung vorantreiben kann (Li 2010). Studien haben den Zusammenhang zwischen einem niedrigen 25(OH)-Vitamin D-Level und Bluthochdruck bei Patienten ohne CKD bestätigt (Feneis und Arora 2010). Vitamin D-Mangel führt zudem zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs, welcher für die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und weiteren inflammatorischen Faktoren verantwortlich ist und damit das Fortschreiten der Gewebsschädigung, Inflammation und Nierenerkrankung determiniert (Li 2010). Ein direkter Zusammenhang zwischen Vitamin D-Mangel und Gewebeschädigung durch Entzündung wurde bereits nachgewiesen (Zhang et al. 2007). Darüber hinaus wurde eine inverse Beziehung zwischen dem Vitamin D-Level und dem Grad der Albuminurie nachgewiesen (De Boer et al. 2007), was auf einen möglichen Anti-Proteinurie-Effekt von Vitamin D schließen lässt.

Mögliche Effekte oder protektive Mechanismen der oralen Vitamin D-Supplementation sind in Abbildung 7 ersichtlich. Bei der zugrunde liegenden Untersuchung von *Takeda et al.* (2012) wurden die Effekte einer oralen

Verabreichung von Calcitriol auf Mäuse untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollen waren die IL-10-Level der mit Calcitriol behandelnden Mäuse signifikant erhöht, proinflammatorische Marker signifikant erniedrigt und eine Unterdrückung der T-Zell-Proliferation konnte beobachtet werden. Es konnten zudem unreife tolerogene DC detektiert werden. Orale Vitamin D-Supplementation reduzierte signifikant die Bildung atherosklerotischer Läsionen und die Akkumulation von Makrophagen und Effektor-T-Zellen im atherosklerotischen Plaque. Somit konnte gezeigt werden, dass eine orale Vitamin D-Gabe nicht nur Einfluss auf intestinale Immunreaktionen, sondern auch auf systemische Immunreaktionen, mit lokalen Prozessen in atherosklerotischen Läsionen, ausübt.



**Abbildung 7** Mögliche Effekte der oralen Vitamin D-Supplementation (aktive Form) auf atherosklerotische Prozesse (nach Takeda et al. 2012)

### 3. Ziele der Arbeit

Die Anzahl zirkulierender DCP im Blut steht in Beziehung zum Immunstatus. Eine Abnahme der zirkulierenden mDCP-Zahl wurde bereits bei Patienten mit KHK verschiedener Schweregrade, stabiler und instabiler Angina pectoris, sowie bei akutem Myokardinfarkt nachgewiesen (Yilmaz et al. 2009, Kretzschmar et al. 2012). Somit könnte die Reduktion dieser zirkulierenden Zellen ein Indikator für das Vorhandensein von CVE sein. Eine signifikante Reduktion der DCP konnte bereits bei Patienten mit CKD im Stadium 5 und im Dialysestadium gezeigt werden (Hesselink et al. 2005). Insofern soll geklärt werden, inwieweit bereits eine Beeinflussung der DCP-Zahlen bei Patienten mit geringgradiger Niereninsuffizienz (Stadium 3) vorliegt und ob Diabetes mellitus, als häufige Ursache der Nierenerkrankung bzw. Komorbidität, einen Einfluss auf die Zellzahl ausübt. Eine koronar und renal relativ gesunde Kontrollgruppe wird dazu zum Vergleich herangezogen.

Weiterhin wurde bereits eine erhöhte Konzentration von Entzündungsmarkern im Blut von CKD-Patienten nachgewiesen (Stinghen et al. 2010), welche ebenfalls ein Risikofaktor für CVE und die Progression atherosklerotischer Prozesse darstellt. Mit dem Fortschreiten der Nierenfunktionsstörung nimmt die Konzentration an Entzündungsmarkern zu (Stinghen et al. 2010). Der inflammatorische Status von Patienten in einem frühen Stadium der CKD soll daher evaluiert werden.

Die Ursache der DCP-Reduktion bei den bisher untersuchten ESRD-Patienten ist noch unklar. Ein Vitamin D-Mangel ist für eine Erhöhung der Gesamtmortalität sowie des CV Risikos, besonders bei CKD Patienten im Stadium 3 bis 5 mit verantwortlich (Pilz et al. 2011, Kalkwarf et al. 2012). Der Vitamin D-Status ist dabei ein unabhängiger Prädiktor für das Fortschreiten von CKD und hat Einfluss auf die angeborene Immunantwort (Liu et al. 2006, Kalkwarf et al. 2012).

Sollte sich also ein Zusammenhang zwischen Vitamin D-Stoffwechsel und DCP erhärten lassen, könnte dies einen pathophysiologischen Link zwischen Vitamin D-Stoffwechsel und Atheroskleroseentwicklung begründen. So wurde in Tierversuchen nach oraler Vitamin D-Gabe eine verminderte Anzahl von DC in atherosklerotischen Läsionen, eine unterdrückte DC-Reifung, sowie ein signifikanter Anstieg von

regulatorischen T-Zellen beobachtet, was zum Rückgang der Formation atherosklerotischer Läsionen führte und damit das Risiko von CVE reduzierte (Takeda et al. 2010). Die Untersuchungen sollen nun klären, inwieweit bei CKD 3-Patienten der Vitamin D-Status, sowie die Vitamin D-Medikation mit der Anzahl zirkulierender DCP assoziiert ist.

Intention der Untersuchung ist es, die DCP-Zahl im peripheren Blut von Patienten mit CKD im Stadium 3 zu messen. Dabei soll ebenfalls geklärt werden, inwieweit die Reduktion der DCP-Zahl mit CVE und KHK-Progression bei CKD assoziiert sind. Es soll der Zusammenhang zwischen DCP und inflammatorischen Entzündungsmarkern bzw. dem Vitamin D-Status untersucht werden.

## 4. Methodik

### 4.1 *Patienten und Untersuchungen*

#### 4.1.1 Auswahl der Patienten und Kontrollpersonen

Die hier untersuchten CKD 3-Patienten stammen aus der gut definierten und in prospektiver Beobachtung hinsichtlich CV und renaler Endpunkte befindlichen Kohorte der German Chronic Kidney Disease Study (GCKD) und wurden über das Regionalzentrum Jena rekrutiert. Die GCKD-Studie ist eine nationale Kohortenstudie von 5217 Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion im Stadium 3 oder großer Proteinurie von  $>0,5$  g/ d. Es handelt sich um eine Beobachtungsstudie mit einem geplanten Beobachtungszeitraum von 10 Jahren. Der Rekrutierungszeitraum der Studie erstreckte sich von Januar 2010 bis März 2012. Biomaterialien wie Blut und Urin wurden zur Baseline- und zu den Follow up-Visiten aller 2 Jahre gesammelt, im Zwischenjahr erfolgt jeweils eine telefonische Befragung über mögliche renale und CV Ereignisse.

Die GCKD-Studie verfügt über ein zentrales Projektmanagement an der Universität Erlangen-Nürnberg mit zentraler Datenbank, Datenkoordinierungszentrum und Biobank. Weiterhin gibt es 9 dezentrale Rekrutierungszentren in den teilnehmenden akademischen Institutionen in Aachen, Berlin, Erlangen, Freiburg, Hannover, Heidelberg, Jena, München und Würzburg. Das Screening und die Rekrutierung der Patienten werden von den regionalen Zentren durchgeführt.

Eingeschlossen wurden weibliche und männliche kaukasische Patienten mit einem Alter zwischen 18 und 74 Jahren, die sich in regelmäßiger (mindestens jährlicher) Behandlung bei einem niedergelassenen Nephrologen oder in einer Klinikambulanz befinden. Patienten mit einer eGFR zwischen 30 bis 60 ml/ min, oder einer Proteinurie  $>0,5$  g/ g Kreatinin bzw. Albuminurie  $>300$  mg/ g Kreatinin bei einer eGFR  $>60$  ml/ min (zum Screeningzeitpunkt) wurden eingeschlossen. Die eGFR und Proteinurie-Werte wurden dabei lokal bestimmt und waren nicht älter als 12 Monate. Ausgeschlossen wurden Patienten mit schwarzafrikanischer oder ostasiatischer Herkunft, Organspender bzw. Transplantierte, nach dem Betreuungsgesetz betreute Patienten, Patienten mit Herzinsuffizienz im Stadium NYHA IV (Herzerkrankung, bei



der Patienten Beschwerden bereits Ruhe verspüren, New York Heart Association IV) und Patienten, die wegen einer Krebserkrankung (Operation, Chemotherapie) in den letzten 2 Jahren behandelt wurden (Eckardt et al. 2011). Innerhalb von 12 Monaten nach dem Screening wurden die Patienten zur Baselinevisite der Studie einbestellt und nach erfolgter Einwilligung in die Studie eingeschlossen.

Im Regionalzentrum Jena wurden von Januar 2011 bis März 2012 aus dem Patientenkollektiv der GCKD-Studie 285 Patienten in die monozentrische „Dendritic Cell Substudy“ eingeschlossen.

Koronar gesunde Patienten (n=85) dienten als Kontrollgruppe. Diese Patienten im Alter zwischen 18 und 74 Jahren erhielten eine Koronarangiografie, die zum Ausschluss einer KHK führte. Patienten mit einer eGFR <90ml/min wurden ausgeschlossen. Die Messung der DCP der Kontrollgruppe sowie die Erhebung von Alter, Größe, Gewicht etc. erfolgte durch die Arbeitsgruppe Yilmaz et al., Klinik für Innere Medizin I, Universitätsklinikum Jena. Die Messung der DCP-Zahl wurde nach dem gleichen Protokoll sowie mit dem gleichen FACS-Gerät durchgeführt.

Die Analyse der Zytokinkonzentration erfolgte durch unsere Arbeitsgruppe.

Für eine zuverlässige Enumeration der zirkulierenden DCP mussten weiterhin folgende Patienten-/ Kontrollpersonen ausgeschlossen werden:

- Patienten mit systemischen Lupus erythematoses
- Patienten mit HIV-Infektion
- Patienten mit chronischer viraler Hepatitis.
- Patienten unter immunsuppressiver Therapie
- Patienten mit Infektionen oder Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Schilddrüsenüberfunktion.

Das positive Ethikvotum, sowie die Einwilligungserklärung für die „Dendritic Cell Substudy“, die jeder Patient unterschreiben musste, sind im Anhang beigelegt (Anhang I, II, III).

#### 4.1.2 Datenerhebung und körperliche Untersuchung

Die Erhebung von Daten über Demografie und Familienanamnese, CV Anamnese, Medikation und Komorbiditäten der CKD 3-Patienten erfolgte während der Baselinevisite. Die Ursache der Nierenerkrankung wurde für jeden einzelnen Patienten mit Hilfe des behandelnden Nephrologen erhoben. Während der körperlichen Untersuchung wurden folgende Parameter aufgezeichnet: Blutdruck, Puls, Größe, Gewicht, Taillen- und Hüftumfang. Weiterhin wurde nach dem Rauchverhalten gefragt. Im Rahmen der Baselinevisite erfolgte laut Studienprogramm zudem bereits die Messung weiterer Parameter im Blut bzw. Urin: Albumin, Kreatinin, CRP, Cholesterin, HDL-, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Kalzium, Phosphat, Cystatin C, Harnstoff, Harnsäure, Natrium, Albumin (Urin) und Kreatinin (Urin).

Die Entnahme zweier zusätzlicher Blutproben (1 EDTA 2.7 ml; 1 Serum 9 ml) zur DCP-Messung fand im Rahmen der Blutabnahme bei der Visite der GCKD-Studie statt. Die Patienten mussten nicht nüchtern sein. Die Blutproben wurden anschließend gekühlt (4°C) in einer Transportbox gelagert und schnellstmöglich zum Labor transportiert. Der Zeitraum zwischen Blutabnahme und Weiterverarbeitung bzw. Messung der Parameter betrug dabei nicht länger als 8 Stunden. Das EDTA-Röhrchen diente dabei der Messung der DCP-Zahl sowie der Leukozytenzahl, während das Serumröhrchen 20 Minuten bei 2000 g zentrifugiert wurde. Der Überstand des Serumröhrchens wurde bei -80°C für die weiteren Messungen (Plasma-Zytokin-Konzentration, 25(OH)-Vitamin D und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D) gelagert.

Die Stabilität bzw. Überlebensrate der DCP wurde zuvor überprüft. Dazu wurden Blutproben von drei Patienten gesammelt und die FACS-Analyse sofort (0 Stunden), nach 8 Stunden und 24 Stunden durchgeführt. In der Zwischenzeit wurden die Blutproben bei 4°C gelagert.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit sowohl einer qualitativen Analyse einer heterogenen Zellsuspension als auch einer quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Grundlage des Verfahrens ist eine AG-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten spezifischen Antikörpern durchgeführt wird.

Bei dem Begriff „FACS“ handelt es sich um eine Abkürzung für „Fluorescence Activated Cell Sorting“ und bezeichnet eigentlich die eingetragene Handelsmarke der Firma Becton-Dickinson.

#### Testprinzip

Voraussetzung einer FACS-Analyse ist eine Einzelzellsuspension (gefärbt), die einzeln durch einen fokussierten Laserstrahl geführt wird. Die Passage einer Zelle durch den Laserstrahl führt zur Streuung des Lichts sowie zur Aktivierung von Fluoreszenzerscheinungen (bei entsprechender Markierung der Zellen) und wird separat detektiert.

Die Streuung des Lichtes wird mittels Detektoren (Photomultiplier) nachgewiesen, wobei die Menge des gestreuten Lichts mit der Größe der Zelle und mit ihrer Komplexität korreliert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sidewards Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits ungefärbt recht gut unterscheiden.

Durch den Einsatz von fluoreszierenden, intrazellulären Farbstoffen (z.B. 5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester) oder Fluoreszenz-markierten Antikörpern lassen sich markierte Zellen innerhalb einer Zellsuspension verfolgen und genauer untersuchen, denn gleichzeitig mit dem gestreuten Licht kann man im Durchflusszytometer Fluoreszenzfarben messen. Durch Einsatz von verschiedenfarbigen Lasern und vor allem Filtern kann die Anzahl der einsetzbaren

Farbstoffe pro Messung und damit die Informationsdichte erhöht werden. Es ist möglich, in einer Messung verschiedene Marker zu detektieren, sofern sich die Wellenlängen des emittierten Fluoreszenzlichts der eingesetzten Fluorophore unterscheiden (Mehrfachfärbungen). Die erhaltenen Messergebnisse werden anschließend mit der Gerätesoftware grafisch dargestellt.

#### 4.2.2 Enumeration der zirkulierenden dendritischen Präkursorzellen

##### Testprinzip:

Unter Anwendung des „Blood Dendritic Cell Enumeration kit<sup>TM</sup>“ (BDCA kit, Miltenyi Biotec) werden pDCP, mDCP-1 und mDCP-2 mittels „four-colour-Färbung“ und FACS-Analyse in frischen Blutproben, welche in EDTA-Röhrchen gesammelt wurden, detektiert. Zirkulierende pDCP und mDCP werden aufgrund ihrer Expression von „Blood dendritic cell antigen“ (BDCA)-1 und BDCA-2 und der Abwesenheit von der Expression von Markern anderer Population der mononukleären Zellen des peripheren Blutes identifiziert.

##### Durchführung:

Dazu werden 300 µl des Blutes mit 20 µl der Anti-BDCA-Lösung mit adäquaten fluorchrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern (CD303 (BDCA-2)-FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), CD1c (BDCA-1)-PE (Phycoerythrin), CD141 (BDCA-3)-PE, und 300 µl des Blutes mit 20 µl mit einer Kontrolllösung mit fluorchromen (FITC, PE, Allophycocyanin)-konjugierten Isotype-Kontroll-monoclonalen Antikörpern gefärbt. Beide Proben werden mit CD19-PE-Cy5, CD14-PE-Cy5 und Propidiumjodid zum Ausschluss von B-Zellen, Monozyten und toten Zellen gefärbt. Die monoclonalen Antikörper, die fürs Färben verwendet werden, werden als vorgefertigte Lösungen mitgeliefert. Die Proben werden anschließend für 10 Minuten unter einer 60 Watt Glühbirne inkubiert. Nach der Zellfärbung werden die Erythrozyten mittels einer spezifischen Lösung lysiert. Die Zellen werden gewaschen und mittels Formaldehyd fixiert. Eine weitere Lösung wird anschließend für den Ausschluss von toten Zellen hinzugeführt. Zum Schluss werden die Zellen mittels „four-color-Durchflusszytometrie“ mit Hilfe eines FACS-Calibur Durchflusszytometer und „CellQuest“ Software (Becton Dickinson) für die Auszählung von pDCP, mDCP-1

und mDCP-2 analysiert. Die Auswertung erfolgt über den PC. Da zirkulierende DCP nur 0.1-1 % der weißen Blutzellen (WBC, white blood cell count) umfassen, wird eine spezielle „gating-Strategie“ zur exakten Analyse der Anzahl von pDCP und mDCP genutzt. In Region R1 wird die WBC von  $2 \cdot 10^5$  registriert, abgegrenzt durch das Vorwärtstreulicht und das Seitwärtstreulicht. In Region 2 werden Granulozyten aufgrund der CD19, CD14 und Propidiumiodid Färbung ausgeschlossen. Zirkulierende pDCP und mDCP werden aufgrund ihrer spezifischen Färbung für BDCA-1 und BDCA-2 in den Regionen R3 und R4 detektiert (Abbildung 8). Dadurch wird die relative Zellzahl von DCP als Prozentsatz der WBC ermittelt. Darauf folgend wird die absolute Zellzahl durch Multiplikation der relativen Zellzahl mit der individuellen Anzahl der WBC im Blut, welche im Zentrallabor des Universitätsklinikums Jena gemessen wurde, berechnet.

Für die Standardisierung der Messung wurden tägliche Kalibrierungen des Durchflusszytometers und eine monatliche Grundreinigung mit Kalibrierung durchgeführt. Zusätzlich wurde eine „Isotype-Kontrollprobe“ bei jeder Analyse zur Kompensation von Unterschieden zwischen den Messungen mitgemessen.

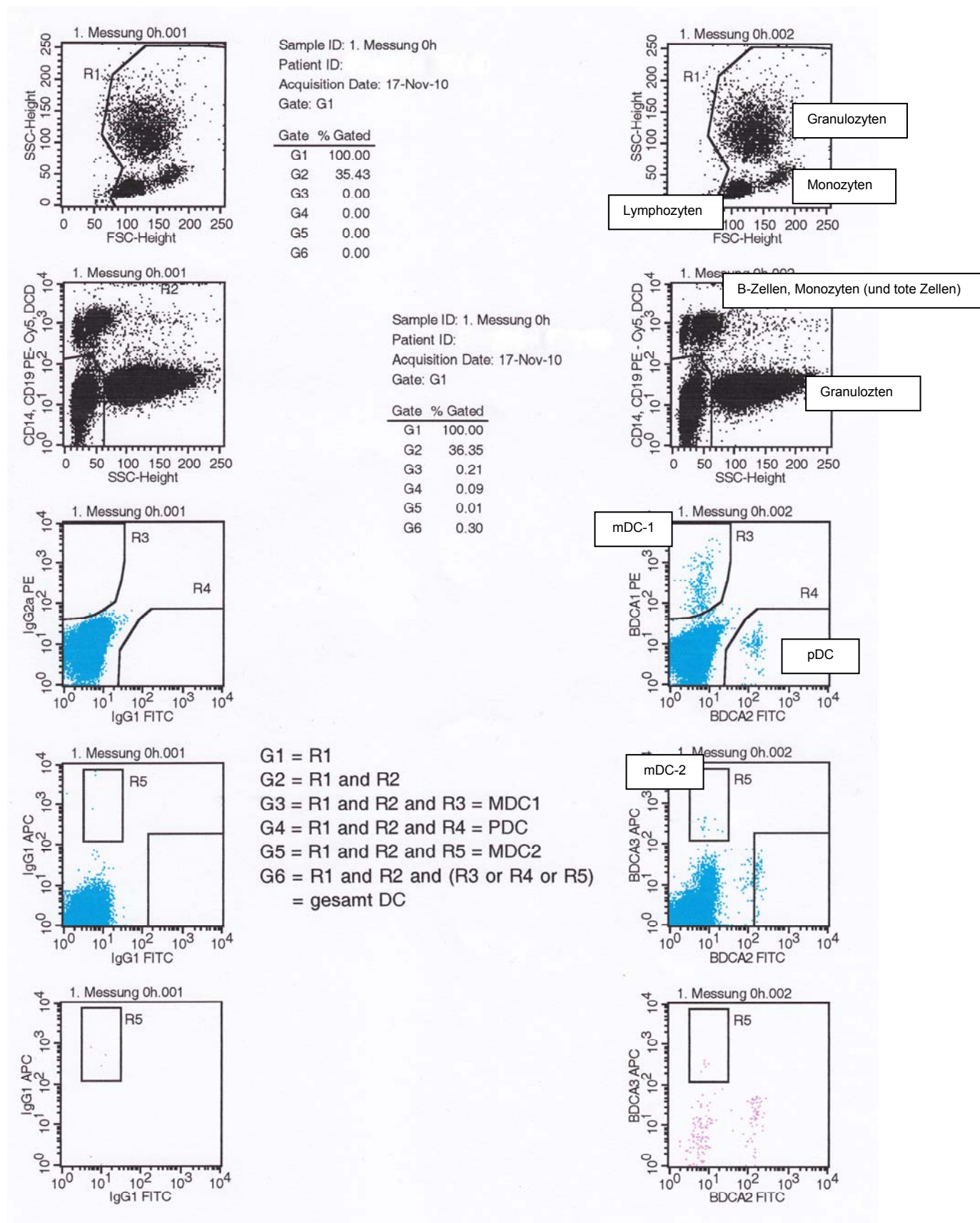


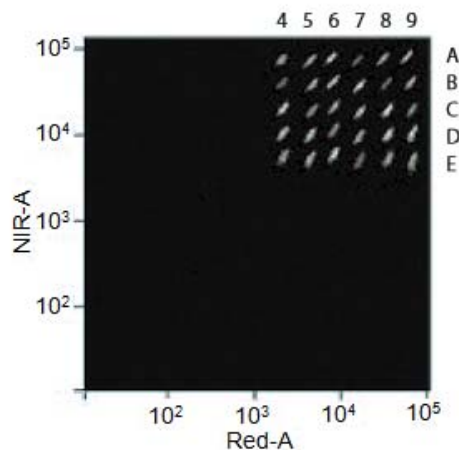
Abbildung 8 Beispiel einer FACS-Analyse

#### 4.2.3 Cytometric Bead Array – Messung von Zytokinen

##### Testprinzip:

Der Cytometric Bead Array (CBA) ist eine Methode zum quantitativen Nachweis löslicher Proteine mittels Durchflusszytometrie. Es handelt sich dabei um einen partikel-basierten Test, der in einer Probe mehrere Proteine gleichzeitig misst (Multiplexing). Für die Quantifikation der Zytokine IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  in den Serumproben kam der „CBA Human Inflammation Kit“ von BD<sup>TM</sup> (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) zur Anwendung.

Mehrere distinkte Partikelpopulationen (hier 3 Bead-Populationen) sind mit einem Fluorochrom so markiert, dass die Populationen anhand der „Fluoreszenzhelligkeit“ unterschieden werden können (Abbildung 9). Jede einzelne Partikelpopulation ist zusätzlich mit Antikörpern, deren Bindungsstelle gegen das nachzuweisende Protein (hier: das spezifische Zytokin-Protein) gerichtet ist, beschichtet. Nach Bindung der zu messenden Proteine erfolgt die Markierung mit Fluorochrom-markierten-Detektionsantikörpern, die an das bereits partikelgebundene Protein binden. Dieses Prinzip basiert auf der Herstellung eines Sandwich-Komplexes. Mittels Durchflusszytometrie findet eine Fluoreszenzmessung statt. Die Messung der gelösten Analyten erfolgt in einem "multiplexed, particle-based immunoassay" mittels FACS. Damit können die drei Zytokine gleichzeitig aus einer kleinen Probenmenge detektiert werden. So erfolgt eine zweidimensionale Auftrennung des Partikelgemischs. Auf Achse 1 finden sich die distinkten Partikelpopulationen. Damit wird die Unterscheidung zwischen den nachzuweisenden Proteinen möglich. Auf der Achse 2 erfolgt die Auftrennung nach Menge des gebundenen Sekundärantikörpers und damit nach Menge des Proteins. Die Zytokine werden über die alphanummerische Zuordnung quantifiziert, dabei befindet sich IL-6 auf Position A7, IL-10 auf Position B7 und TNF- $\alpha$  auf Position C4 (Abbildung 9). Unter Zuhilfenahme der „BD<sup>TM</sup> CBA Analysis Software“ können die Ergebnisse graphisch und tabellarisch dargestellt werden. Unter Berücksichtigung der Standardkurven sowie bestimmter Limitationen der Spezifität und Präzision in der Messung der einzelnen Plasma-Zytokin-Konzentrationen werden diese in pg/ ml berechnet.



**Abbildung 9** Quantifikation der Zytokine IL-6 (A7), IL-10 (B7) und TNF- $\alpha$  (C4) mit Hilfe einer alphanumerischen Zuordnung

#### Durchführung:

##### Vorbereitung der Serumproben:

Die eingefrorenen Serumproben werden bei Raumtemperatur aufgetaut und sofort nach dem Auftauen auf Eis gestellt. Entsprechend der Probenanzahl werden FACS-Röhrchen beschriftet. Die Serumproben werden anschließend 1:3 mit Assay Diluent verdünnt, dazu werden 33,4  $\mu$ l Assay Diluent in jedes FACS-Tube vorgelegt und anschließend 16,7  $\mu$ l des Serums in das entsprechend beschriftete FACS-Tube pipettiert.

##### Herstellung der Standard-Stock-Solution und der Standardreihe:

In jeder Standard-Flasche sind 1 bis 2 Standardsphären, die alle zusammen in eine 15 ml-Polypropylen-Röhre gegeben werden. Dazu werden 4 ml des „Assay Diluent“ gegeben und gründlich durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend lässt man den Standard-Stock 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. In der Inkubationszeit werden acht 15 ml-Polypropylen-Röhren für die Standardreihe beschriftet und der „Assay Diluent“ vorgelegt. Dabei wird in den Top-Standard 920  $\mu$ l „Assay Diluent“ vorgelegt, in die anderen Polypropylen-Röhren jeweils 1 ml. Nach der Inkubation des Standards (Stock) werden 80  $\mu$ l aus dem Stock-Standard in die Polypropylen-Röhre des Top-Standards überführt, dabei wird zuerst die Stock-Standard-Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend wird die hergestellte Lösung durch Auf- und Abpipettieren gemischt und 500  $\mu$ l daraus in die Polypropylen-Röhre mit der Verdünnung 1:3 pipettiert.



Danach muss die hergestellte Verdünnung 1:3 durch Auf- und Abpipettieren gemischt und 500 µl daraus in die Lösung 1:9 pipettiert werden. So fährt man fort, bis zuletzt 500 µl von hergestellter Lösung 1:729 in Lösung 1:21783 pipettiert werden. Der Standard S1 ist später der „Assay Diluent“. Die verdünnte Standardreihe wird entsprechend in die beschrifteten FACS-Tubes überführt, pro FACS-Tube ist ein Volumen von 50 µl notwendig.

#### Herstellung der Capture Beads:

Die Herstellung der Capture Beads richtet sich nach der Menge der verwendeten verschiedenen Zytokinen und der Anzahl der zu messenden Proben. Die Standards werden dabei mit eingerechnet. Pro Probe berechnet man 1µl Capture Bead, für jedes Bead extra.

#### Herstellung des Detection Reagent A:

Die Herstellung richtet sich hierbei nach der Menge der verwendeten verschiedenen Zytokine und der Anzahl der zu messenden Proben, die Standards müssen hierbei mit eingerechnet werden. Pro Probe und pro Zytokin berechnet man 1µl Human Detection Reagent Part A.

#### Herstellung der Detection Reagent B:

Das lyophilisierte Enhanced Sensitivity Detection Reagent Part B wird mit 550 µl Detection Reagent Diluent konstituiert und anschließend 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wird es durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt und 1:10 mit dem Detection Reagent Diluent verdünnt.

#### Weiteres Vorgehen:

Es wird in jedes FACS-Tube mit den darin enthaltenen verdünnten Serumproben 20µl der Capture Beads pipettiert, die Tubes werden im Vortexer geschüttelt und für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird zu jedem FACS-Tube 20 µl Detection Reagent A gegeben, vorsichtig gevortext und 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird 1 ml Wasch-Puffer in jedes Tube gegeben. Die Tubes werden anschließend 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgekippt, der

Rücklauf jedoch nicht verworfen. In jedes Tube werden 100 µl Detection Reagent Part B geben, die Tubes werden kurz gevortext und 1 Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wird wieder 1 ml Wasch-Puffer in jedes Tube gegeben und die Tubes 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wird wieder abgekippt, der Rücklauf wird nicht verworfen. Daraufhin wird in jedes Tube 300 µl Wasch-Puffer gegeben und die Messung am Durchflusszytometer durchgeführt.

#### 4.2.4 25(OH)-Vitamin D-Messung

##### Testprinzip:

Der Test basiert auf einer kompetitiven ELISA-Technik, wobei ein monoklonaler Antikörper verwendet wird, der 25(OH)-Vitamin D erkennt.

25(OH)-Vitamin D wird von dem 25(OH)-Vitamin-D-Vitamin D-bindendem Protein-Komplex freigesetzt, weshalb alle zu untersuchenden Proben (Standards, Kontrollen und Patientenseren) mit dieser Freisetzungsreagenz inkubiert werden. Das Vorinkubat wird anschließend in die Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit 25(OH)-Vitamin D beschichtet wurden. Anti-25(OH)-Vitamin D wird dazu pipettiert. Das 25(OH)-Vitamin D aus der Probe kompetiert mit dem auf der Platte gekoppeltem 25(OH)-Vitamin D um die Bindungsstelle am Antikörper. Anschließend wird Peroxidase-markiertes Konjugat zugegeben, wobei sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte bildet: 25(OH)-Vitamin D- Anti-25(OH)-Vitamin D-Antikörper-Peroxidase-Konjugat. Als Substrat für die Peroxidase wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt und anschließend wird die Enzymreaktion durch die Zugabe von Säure abgestoppt. Dabei erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Es entsteht eine chromogene Verbindung, die photometrisch bei 450 nm gemessen wird. Der 25(OH)-Vitamin D-Gehalt ist umgekehrt proportional zur Intensität der Farbe. Es wird eine Standardkurve aus der optischen Dichte (Absorption bei 450 nm) und der Standardkonzentrationen erstellt, aus der die Konzentration der Proben errechnet werden kann.

### Durchführung:

Für die quantitative Bestimmung von 25(OH)-Vitamin D aus humanem Serum wird der „25(OH)-Vitamin D Xpress ELISA Kit“ der Firma Immundiagnostik verwendet.

Für die Messung wurden die Serumproben aufgetaut und mit den Reagenzien des ELISA Kits auf Raumtemperatur gebracht.

Es werden jeweils 10 µl vom mitgelieferten Kalibrator, den mitgelieferten Kontrollen und den zu bestimmenden Patientenproben in sogenannte V-Tubes vorgelegt.

Das Freisetzungsreagenz wird in einer Rekonstitutionslösung aufgelöst, anschließend werden jeweils 300 µl der entstandenen Lösung in die Tubes pipettiert und kurz gevortext. Danach werden 100 µl des Kalibrators, der Proben und Kontrollen aus den V-Tubes in die Mikrotiterstreifen pipettiert und für 75 Minuten bei 37°C unter Schütteln (900Upm) inkubiert.

Nach der Inkubation werden 100 µl des Probenverdünnungspuffers und 50 µl des 25(OH)-Vitamin D-Antikörpers in alle Vertiefungen pipettiert und nochmals für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Währenddessen wird der verdünnte Waschpuffer hergestellt, indem das Waschpufferkonzentrat 1:10 in destilliertem Wasser verdünnt werden muss.

Anschließend erfolgt ein Waschschrift, bei dem der Inhalt der Vertiefungen verworfen wird und alle Vertiefungen fünfmal mit je 350 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen werden. Nach der Zugabe von 150 µl Konjugat und einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C unter Schütteln erfolgt ein weiterer Waschschrift. Danach werden 150 µl des Substrats in alle Vertiefungen pipettiert und für 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem 150 µl Stopplösung in alle Vertiefungen pipettiert wurde, wird die Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer sofort bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm gemessen. Die Auswertung wird mit Hilfe der Software Magellan V6.6 und dem dafür entwickelten und von immundiagnostik® zur Verfügung gestellten „VitD Xpress-Protokoll“ durchgeführt.

#### 4.2.5 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Messung

##### Testprinzip:

Der Test basiert auf einer kompetitiven Enzym-Immun-Assay Technik, wobei ein monoklonaler Antikörper verwendet wird, der 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D erkennt.

Zunächst erfolgt ein Extraktionsschritt, bei dem das 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D der Standards, NSB (nicht spezifische Bindung), Kontrollen und der Patientenseren eluiert wird. Anschließend werden die Standards, NSB, Kontrollen und Patientenseren mit einem Detektionsantikörper versetzt. Bei der so genannten Vorinkubation bindet das 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D an einen Antikörper. Das Vorinkubat wird in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Mikrotiterplatte ist mit 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D beschichtet, welches mit dem 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D aus der Probe um die Bindungsstelle am Detektionsantikörper kompetiert. Als Konjugat wird ein Peroxidase-markierter-Anti-Maus-Antikörper zugegeben, wobei folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte entsteht: 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Detektionsantikörper-Peroxidase-Konjugat. Als Substrat für die Peroxidase wird Tetramethylbenzidin eingesetzt. Anschließend wird die Enzymreaktion durch die Zugabe von Säure abgestoppt. Dabei wird ein Farbumschlag von blau nach gelb sichtbar. Es entsteht eine chromogene Verbindung, die photometrisch bei 450 nm gemessen wird. Der 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Gehalt ist umgekehrt proportional zur Intensität der Farbe. Es wird eine Standardkurve aus der optischen Dichte (Absorption bei 450 nm) und der Standardkonzentrationen erstellt, aus der die Konzentration der Proben errechnet werden kann.

##### Durchführung:

###### Extraktion:

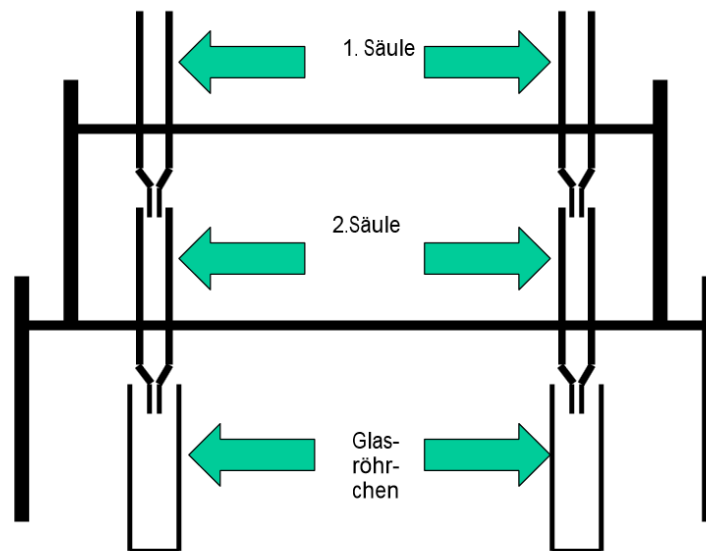
Der Extraktionsständer besteht aus 3 Plexiglas-Untereinheiten, die übereinander gestellt werden (Abbildung 10).

Für die Extraktion werden 1 ml des Standards, der Kontrollen, NSB bzw. der Proben in Einzelwerten auf die Chromabond (Ständereinheit I) aufgetragen. Mit viermal 1 ml Diisopropylether wird in je 3 minütigem Abstand das 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D von den

Chromabond-Säulen direkt in die Silica-Kartuschen extrahiert (Ständereinheit II). Anschließend werden die Chromabond-Säulen entfernt.

Die Silica-Kartuschen werden anschließend fünfmal mit 2 ml Isopropanol/Hexan (4/96 v/v) und dreimal mit 2 ml Isopropanol/Hexan (6/94) gewaschen und auf die Ständereinheit III mit den Glasröhrchen gestellt.

Die Eluierung des 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D wird mit zweimal 2 ml Isopropanol/Hexan (25/75 v/v) durchgeführt. Die eluierten Proben werden anschließend unter leichtem Stickstoffstrom bei 37°C eingetrocknet.



**Abbildung 10 Extraktion der Proben bei der 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Messung**

**Vorinkubation:**

Zu jeder eingetrockneten Probe werden 20 µl Ethanol pipettiert und für ca. eine Sekunde vorsichtig gevortext. Danach werden 450 µl Antikörperlösung zugegeben und für weitere 10 Sekunden gevortext. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für eine Stunde.

**Messung:**

Zweihundert µl der Standards/ NSB/ Patientenproben/ Kontrollen werden in Doppelbestimmungen in die Mikrotiterstreifen pipettiert und für 18 bis 22 Stunden bei 6°C bis 10°C inkubiert. Anschließend wird der Inhalt der Vertiefungen verworfen, fünfmal mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen und die Reste vom Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Es werden 200 µl

Konjugat in alle Vertiefungen pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der Inhalt der Vertiefungen wird wieder verworfen, fünfmal mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer gewaschen und die Reste vom Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernt. Es werden anschließend 200 µl Substrat in alle Vertiefungen pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Stopplösung, wird die Extinktion sofort bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm gemessen.

Die Auswertung wird mit Hilfe der Software Magellan V6.6 und dem dafür entwickelten und von immundiagnostik® zur Verfügung gestellten Protokoll durchgeführt.

#### 4.2.6 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Die Datenerfassung und Auswertung wurde mit Hilfe von Excel 2010, sowie der Statistiksoftware SPSS Statistics (Version 20.0) erstellt. Alle Messwerte wurden als Median (Minimum, Maximum) bzw. Mittelwert ( $\pm$  Standardabweichung) angegeben. Der T-Test (für normal verteilte Daten) und der Mann-Whitney-U-Test (für nicht normal verteilte Daten) wurden zum Vergleich zweier unabhängigen Stichproben verwendet. Ordinale Daten (z. B. Geschlecht, Bluthochdruck, Rauchverhalten, diabetische Komorbidität) wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests verglichen. Beziehungen zwischen Variablen wurden mit dem Korrelationskoeffizient nach Pearson (für normalverteilte Daten) und dem Korrelationskoeffizient nach Spearman (für nicht normalverteilte Daten) berechnet. P-Werte  $<0.05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Aufgrund der Übersichtlichkeit in den Tabellen und der Übertragbarkeit ins Englische wurden Punkte als Dezimaltrennzeichen verwendet. Zur graphischen Darstellung der ermittelten Ergebnisse dienen unter anderem Boxplots. Dabei kennzeichnen die Markierungen außerhalb der Box das 5 %- bzw. das 95 %-Quantil. Die Box wird begrenzt durch das 25 % - und das 75 %-Quantil. Der Median ist als Querlinie symbolisiert. Ausreißer werden durch schwarze Punkte (●) markiert.

Die Kontrollpatienten und die CKD 3-Patienten unterscheiden sich bezüglich einiger Parameter (z. B. Alter und Geschlecht), welche die Anzahl der DCP beeinflussen könnten. Aus diesem Grund wurde eine lineare Regression durchgeführt, wobei die

DCP-Zahl als abhängige Variable betrachtet wurde. Alter, männliches Geschlecht, Diabetes mellitus, Bluthochdruck, Rauchverhalten, CRP, Kreatinin, Gesamtcholesterin, HDL, LDL und Triglyzeride wurden als unabhängige Variablen eingesetzt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Stabilität bzw. Überlebensrate der zirkulierenden dendritischen Präkursorzellen nach Blutabnahme

Mittels FACS-Analyse konnte keine Abweichung zwischen der Anzahl der DCP direkt nach der Blutabnahme sowie nach 8 Stunden verzeichnet werden. Die Anzahl der DCP erniedrigt sich erst nach 24 Stunden (Tabelle 1). Basierend auf diesen Ergebnissen und um maximale Genauigkeit zu erlangen, wurden alle Blutproben innerhalb von 8 Stunden nach der Blutabnahme analysiert.

**Tabelle 1 DCP-Anzahl im Zeitverlauf - Mittelwerte von DCP dreier verschiedener Blutproben von drei Patienten**

Mediane der DCP in % von WBC	Zeitpunkt der FACS-Analyse nach der Blutabnahme		
	<b>sofort</b>	<b>nach 8 Stunden</b>	<b>nach 24 Stunden</b>
TDGP	0.24	0.24	0.22
PDGP	0.05	0.05	0.04
MDGP	0.19	0.19	0.18
MDGP-1	0.18	0.18	0.18
MDGP-2	0.01	0.01	0.00

### 5.2 Klinische Daten der chronisch niereninsuffizienten Patienten im Stadium 3 und der Kontrollen

Klinische Daten der 287 CKD 3-Patienten und sowie der 85 koronar gesunden Kontrollen sind in Tabelle 2 dargestellt.

Die genutzte CKD 3-Kohorte ist im Mittel 66 Jahre alt und 59 % sind männlich. Neunzig Prozent dieser Patienten leiden an Bluthochdruck und fast 40 % an Diabetes mellitus. Die Hälfte der Patienten ist aktiver Raucher oder Ex-Raucher. Mit einem BMI von  $29 \text{ kg/m}^2$  ist die Kohorte präadipös (Deutsche Adipositas Gesellschaft). Der eGFR-Wert des Screenings ist signifikant niedriger als der eGFR-Wert bei der Visite ( $p=0.041$ ). Zwischen der Erhebung der eGFR beim Screening und



der eGFR bei der Visite können bis zu 24 Monate liegen. Die beim Screening als für die Studie passend gescreeenten Patienten müssen laut Standardarbeitsanweisung der GCKD-Studie innerhalb von 12 Monaten die Baselinevisite absolvieren, ihre beim Screening erhobenen eGFR-Werte dürfen dabei zudem nicht älter als 12 Monate sein. Der CRP-Wert liegt im Mittel bei 2.1 mg/ l.

Im Vergleich zu den weiblichen CKD 3-Patienten, leiden signifikant mehr männliche CKD 3-Patienten an Diabetes mellitus ( $p=0.009$ ) und Bluthochdruck ( $p<0.001$ ). Signifikant mehr männliche CKD 3-Patienten rauchen bzw. sind Ex-Raucher ( $p<0.001$ ). Die Serumkonzentrationen von Kreatinin ( $p<0.001$ ), Cystatin C ( $p<0.001$ ), Harnstoff ( $p<0.001$ ), und Harnsäure ( $p=0.025$ ) sowie die Triglyzeride ( $p=0.006$ ) sind bei den männlichen CKD 3-Patienten im Vergleich zu den weiblichen CKD 3-Patienten signifikant erhöht. Albumin ( $p<0.001$ ) im Urin ist ebenfalls bei den männlichen CKD 3-Patienten signifikant erhöht. Weibliche CKD 3-Patienten weisen signifikant höhere HDL- ( $p=0.016$ ) und Phosphatkonzentrationen ( $p=0.020$ ) im Blut im Vergleich zu den männlichen CKD 3-Patienten auf.

CKD 3-Patienten, die zuvor einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall erlitten oder sich einer Behandlung aufgrund einer peripheren Gefäßerkrankung oder einer KHK einer Herzkatheteruntersuchung mit Stentimplantation oder Ballondilatation unterziehen mussten, werden als Patienten mit Vorgeschichte von CVE definiert (CKD 3 mit CVE,  $n=122$ ). Die übrigen 165 Patienten werden als Patienten ohne bisherige CVE (CKD 3 ohne CVE) bezeichnet.

Im Rahmen der Visiten wurden die behandelnden Nephrologen gebeten, für jeden Patienten die Ursache der Nierenerkrankung anzugeben. Die zugrunde liegenden Nierenerkrankungen waren wie folgt: 30.7 % hypertensive Nephropathie, 16.0 % diabetische Nephropathie, 10.2 % glomeruläre Nephropathie, 9.8 % interstitielle Nephropathie, 3.8 % polyzystische Nephropathie, 1 % vaskuläre Nephropathie, 23.6 % hatten weitere Ursachen und bei 4.9 % ist die Ursache unbekannt.

Gesunde Patienten ( $n=85$ ), bei denen zuvor das Vorhandensein einer KHK durch eine Herzkatheteruntersuchung ausgeschlossen worden war, wurden als koronar gesunde Kontrollgruppe herangezogen. Eine eGFR von  $\leq 60$  ml/ min wurde ebenfalls als Ausschlusskriterium für die Kontrollen angeführt, weshalb sich die Kontrollen signifikant von den CKD 3-Patienten hinsichtlich der eGFR ( $p<0.001$ ) und dem

gemessenen Kreatininwert ( $p < 0.001$ ) unterscheiden. Die koronar gesunden Kontrollen waren im Mittel 58 Jahre alt und damit signifikant jünger als die CKD 3-Patienten (66 Jahre,  $p < 0.001$ ). Signifikant weniger von ihnen sind männlich (43 % vs. 59%,  $p < 0.007$ ), leiden an Diabetes mellitus (13 % vs. 39 %,  $p < 0.001$ ) oder Bluthochdruck (71 % vs. 90 %,  $p < 0.001$ ) im Vergleich zu den CKD 3-Patienten. Zudem hatten die Kontrollen einen signifikant niedrigeren BMI ( $p = 0.005$ ).

Hinsichtlich des Rauchverhaltens, der Größe und des Gewichts, sowie der Leukozytenzahl, der Cholesterin-, HDL- und LDL-Werte unterscheiden sich die koronar gesunden Kontrollen und die CKD 3-Patienten nicht. Das CRP lag auch bei den Kontrollpatienten im Mittel bei 2.0 mg/l (Tabelle 2).

**Tabelle 2 Klinische Daten der Kontrollen und CKD 3-Patienten**

	Kontrollen	CKD 3-Patienten	P-Wert <sup>1</sup>	CKD 3-Patienten männlich	CKD 3-Patienten weiblich	P-Wert <sup>2</sup>
	(n = 85)	(n = 287)		(n = 169)	(n = 118)	
Alter (Jahre)	58 (21, 78) 58 ± 11	66 (30, 75) 63 ± 9	<0.001	66 (32, 75) 64 ± 8	66 (30, 75) 63 ± 10	ns
Männl. Geschlecht (%)	43	59	0.007	-	-	-
Diabetes mellitus (%)	13	39	< 0.001	45	30	0,009
Bluthochdruck (%)	71	90	< 0.001	95	83	< 0.001
Raucher und Ex-Raucher (%)	38	51	ns	67	28	< 0.001
C-reaktives Protein (mg/ l)	2.0 (2.0, 9.0) 2.9 ± 1.5	2.1 (2.0, 8.6) 3.1 ± 1.7	ns	2.4 (2.0, 32.8) 4.4 ± 4.4	2.2 (2.0, 20.9) 4.5 ± 4.3	
hsCRP (mg/ l)	-	2.3 (0.2, 32.8) 4.0 ± 4.6	-	2.4 (0.2, 32.8) 4.1 ± 4.6	2.2 (0.2, 20.9) 4.0 ± 4.6	ns
Leukozyten (Gpt/ l)	6.9 (4.2, 12.0) 7.1 ± 1.5	6.4 (3.6, 12.7) 6.5 ± 1.6	ns	6.6 (3.8, 12.0) 6.89 ± 1.75	6.3 (3.6, 12.7) 6.3 ± 1.5	ns
Größe (m)	1.68 (1.45, 1.92) 1.69 ± 0.94	1.7 (1.49, 1.96) 1.7 ± 0.1	ns	1.8 (1.5, 2.0) 1.8 ± 0,1	1.6 (1.5, 1.8) 1.6 ± 0.1	ns
Gewicht (kg)	77.0 (37.4, 175.0) 79.1 ± 19.6	84.5 (46.0, 154.0) 86.8 ± 18.7	ns	90.0 (60.0, 154.0) 92.7 ± 17.2	76.8 (46.0, 129.0) 78.3 ± 17.3	ns
BMI (kg/ m <sup>2</sup> )	27.3 (13.3, 54.6) 27.7 ± 6.1	29.0 (17.0, 47.0) 29.9 ± 5.7	0.005	29.2 (18.8, 47.4) 30.2 ± 5.2	27.9 (16.9, 45.6) 29.4 ± 6.1	ns
eGFR (Screening, ml/ min/ 1.73 m <sup>2</sup> )	-	46.1 (30.0, 118.0) 47.4 ± 13.2	-	46.0 (30.0, 118.0) 47.2 ± 13.6	47.0 (30.0, 110.8) 47.6 ± 12.5	ns
eGFR (Visite, ml/ min/ 1.73 m <sup>2</sup> )	82.8 (60.3, 215.4) 85.1 ± 20.4	48.0 (17.9, 125.2) 48.6 ± 15.2	<0.001	46.7 (17.9, 125.2) 47.4 ± 15.7	48.7 (25.2, 110.8) 50.3 ± 14.3	ns
Albumin (g/ l)	-	39.0 (15.2, 49.8) 38.7 ± 3.7	-	39.2 (15.2, 46.5) 38.8 ± 4.0	38.6 (31.6, 49.8) 38.6 ± 3.1	ns
Kreatinin (mg/ dl)	0.88 (0.34, 1.26) 0.87 ± 0.15	1.44 (0.61, 3.64) 1.51 ± 0.48	<0.001	1.62 (0.69, 3.64) 1.71 ± 0.48	1.18 (0.61, 2.11) 1.23 ± 0.29	<0.001
Cholesterin (mg/ dl)	217.0 (121.0, 328.0) 222.0 ± 47.0	204.1 (90.8, 410.7) 205.0 ± 48.1	ns	187.2 (90.8, 323.1) 190.3 ± 43.1	221.4 (136.6, 410.7) 225.6 ± 47.0	ns
HDL (mg/ dl)	56.0 (24.0, 108.0) 55.5 ± 16.7	47.7 (20.8, 119.2) 50.2 ± 16.7	ns	43.2 (20.8, 92.5) 44.6 ± 13.4	55.9 (21.4, 119.2) 58.1 ± 17.5	0.016
LDL (mg/ dl)	135.0 (64.6, 218.0) 140.5 ± 37.3	109.6 (20.9, 278.2) 112.7 ± 42.4	ns	98.5 (20.9, 226.2) 101.2 ± 36.9	122.7 (52.9, 278.2) 128.7 ± 44.2	ns
Triglyzeride (mg/ dl)	127.0 (48.1, 513.6) 147.6 ± 80.2	183.8 (37.3, 806.0) 202.7 ± 113.6	<0.001	205.2 (47.7, 578.8) 218.2 ± 115.6	160.3 (37.3, 806.0) 181.0 ± 106.4	0.006
Calcium (mmol/ l)	-	2.3 (1.6, 2.9) 2.3 ± 0.1	-	2.3 (1.7, 2.9) 2.2 ± 0.1	2.3 (1.6, 2.5) 2.3 ± 0.1	ns
Phosphat (mmol/ l)	-	1.1 (0.6, 2.3) 1.1 ± 0.2	-	1.1 (0.6, 2.3) 1.1 ± 0.2	1.2 (0.7, 1.6) 1.1 ± 0.2	0.020
Cystatin C (mg/ l)	-	1.4 (0.7, 7.0) 1.5 ± 0.6	-	1.5 (0.8, 7.0) 1.6 ± 0.6	1.2 (0.7, 2.7) 1.3 ± 0.4	<0.001
Harnstoff (mg/ dl)	-	26.4 (8.9, 96.2) 28.9 ± 12.3	-	28.3 (8.9, 96.2) 31.2 ± 13.3	23.3 (9.1, 66.7) 25.6 ± 9.7	<0.001
Harnsäure (mg/ dl)	-	7.0 (1.9, 15.5) 7.1 ± 1.9	-	7.5 (3.1, 15.5) 7.7 ± 1.9	6.3 (1.9, 9.8) 6.3 ± 1.5	0.025
Natrium (mmol/ l)	-	140.2 (130.6, 151.3) 140.3 ± 2.6	-	140.3 (130.6, 151.3) 140.3 ± 2.7	140.2 (134.5, 147.0) 140.2 ± 2.4	ns
Albumin/ Urin (mg/ l)	-	21.0 (0.0, 4398.7) 183.7 ± 428.3	-	42.3 (0.1, 4398.7) 261.2 ± 529.1	7.1 (0.0, 1183.0) 77.7 ± 178.8	<0.001
Kreatinin/ Urin (mg/ dl)	-	64.6 (9.0, 513.3) 77.4 ± 59.4	-	74.4 (12.5, 513.3) 84.0 ± 62.8	46.2 (9.0, 313.1) 68.4 ± 52.8	0.004

<sup>1</sup> CKD 3-Patienten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten<sup>2</sup> CKD 3-Patienten (m) im Vergleich zu CKD 3-Patienten (w) nach entsprechendem T-Test, Mann-Whitney-Test oder Chi-Quadrat-Test

### 5.3 Zirkulierende dendritische Präkursorzellzahl bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3

#### Vergleich der DCP-Zahl im peripheren Blut von CKD 3-Patienten mit Kontrollen

Die Anzahl der zirkulierenden DCP sind in Tabelle 3 dargestellt. In jeder Subpopulation der DCP, als auch bei der Gesamtzellzahl ist eine signifikante Reduktion bei CKD 3-Patienten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollen zu erkennen (Tabelle 3, Abbildung 11, jeweils  $p < 0.001$ ). CKD 3-Patienten hatten dabei 29 % niedrigere absolute mDCP-Zahlen als die Kontrollen ( $p < 0.001$ ). Betrachtet man die absoluten Zahlen der pDCP von CKD 3-Patienten, so sind diese signifikant niedriger (44 % niedriger,  $p < 0.001$ ) als die der Kontrollgruppe. Folglich sind die tDCP-Zahlen der CKD 3-Patienten auch signifikant niedriger (39 % niedriger,  $p < 0.001$ ). Insbesondere zeigt sich eine Erniedrigung der relativen DCP bei CKD 3-Patienten im Vergleich zu Kontrollen (Tabelle 3, jeweils  $p < 0.001$ ).

Da die relativen und die absoluten Zellzahlen von DCP erniedrigt sind, kann ausgeschlossen werden, dass diese Erniedrigung durch ein Verdünnungsphänomen aufgrund eines Anstiegs in einer anderen Population der mononukleären Zellen des peripheren Blutes entstanden ist.

**Tabelle 3 Anzahl zirkulierender DCP der CKD 3-Patienten und Kontrollen**

	Kontrollen (n=85)	CKD 3-Patienten (n=287)	P-Wert <sup>1</sup>
<b>Anzahl zirkulierender DCP</b>			
mDCP rel. (% von WBC)	0.22 (0.09, 0.58) 0.24 ± 0.10	0.17 (0.03, 0.44) 0.18 ± 0.07	<0.001
pDCP rel. (% von WBC)	0.13 (0.04, 0.30) 0.14 ± 0.06	0.08 (0.02, 0.40) 0.09 ± 0.04	<0.001
tDCP rel. (% von WBC)	0.38 (0.15, 0.76) 0.39 ± 0.13	0.26 (0.06, 0.58) 0.27 ± 0.10	<0.001
mDCP abs. (Zellen/ µl)	15.3 (5.2, 34.4) 16.8 ± 7.2	10.8 (3.2, 35.6) 11.4 ± 4.7	<0.001
pDCP abs. (Zellen/ µl)	8.9 (2.5, 16.5) 9.2 ± 3.7	5.0 (1.1, 16.7) 5.5 ± 2.7	<0.001
tDCP abs. (Zellen/ µl)	27.3 (9.6, 67.8) 27.2 ± 10.0	16.8 (4.3, 46.2) 17.5 ± 6.1	<0.001

<sup>1</sup> CKD 3-Patienten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten

Die Kontrollen unterscheiden sich hinsichtlich des Alters ( $p < 0.001$ ) und des Geschlechts ( $p = 0.007$ ) signifikant im Vergleich zu den CKD 3-Patienten. Die mDCP- und pDCP-Zahlen der Kontrollgruppe wurden mit dem Alter und dem Geschlecht korreliert. Es konnte eine schwach signifikante Korrelation zwischen dem Alter und der mDCP-Zahl ( $r = -0.220$ ,  $p = 0.043$ ) beobachtet werden, pDCP korrelierten nicht mit dem Alter. Das Geschlecht hatte keinen Einfluss auf die DCP-Zahl der Kontrollen.

Männliche CKD 3-Patienten wiesen signifikant höhere absolute mDCP-Zahlen im Vergleich zu weiblichen CKD 3-Patienten auf (11.5 Zellen/ $\mu$ l vs. 10.3 Zellen/ $\mu$ l,  $p = 0.010$ ). Die relativen DCP-Zahlen, sowie die absoluten pDCP- und tDCP-Zahlen unterschieden sich geschlechterspezifisch nicht ( $p = \text{ns}$ ). Bei den männlichen CKD 3-Patienten konnten lediglich tendenziell höhere absolute pDCP- und tDCP-Zahlen detektiert werden.

Eine lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um potentielle Confounder, die für eine Erniedrigung der DCP-Zahl bei CKD 3-Patienten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten verantwortlich sein könnten, auszuschließen. Die Anzahl absoluter mDCP-, pDCP-, und tDCP blieb signifikant reduziert im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollen (Tabelle 4, jeweils  $p < 0.001$ ).

**Tabelle 4      Lineare Regression**

<b>Abhängige Variable</b>		<b>Koeffizient (SE)</b>	<b>P-Wert</b>
<b>mDCP (Zellen/ µl)</b>	Intercept-Wert	2.935	<0.001
	Alter (Jahre)	0.032	0.032
	Männl. Geschlecht	0.713	0.002
	Diabetes mellitus (%)	0.638	0.050
	Bluthochdruck (%)	0.867	0.334
	Raucher/ Ex-Raucher (%)	0.621	0.501
	CRP (mg/ l)	0.071	0.082
	Kreatinin (mg/ dl)	0.766	0.720
	Cholesterin (mg/ dl)	0.033	0.937
	HDL (mg/ dl)	0.036	0.751
	LDL (mg/ dl)	0.034	0.690
	Triglyceride (mg/ dl)	0.006	0.514
	Kontrollen	0.859	<0.001
<b>pDCP (Zellen/ µl)</b>	Intercept-Wert	1.624	<0.001
	Alter (Jahre)	0.017	0.163
	Männl. Geschlecht	0.394	0.247
	Diabetes mellitus (%)	0.353	0.030
	Bluthochdruck (%)	0.480	0.478
	Raucher/ Ex-Raucher (%)	0.344	0.801
	CRP (mg/ l)	0.040	0.927
	Kreatinin (mg/ dl)	0.424	0.208
	Cholesterin (mg/ dl)	0.018	0.109
	HDL (mg/ dl)	0.020	0.375
	LDL (mg/ dl)	0.019	0.111
	Triglyceride (mg/ dl)	0.003	0.191
	Kontrollen	0.475	<0.001
<b>tDCP (Zellen/ µl)</b>	Intercept-Wert	3.897	<0.001
	Alter (Jahre)	0.042	0.007
	Männl. Geschlecht	0.946	0.001
	Diabetes mellitus (%)	0.847	0.018
	Bluthochdruck (%)	1.151	0.200
	Raucher/ Ex-Raucher (%)	0.824	0.916
	CRP (mg/ l)	0.095	0.229
	Kreatinin (mg/ dl)	1.017	0.727
	Cholesterin (mg/ dl)	0.043	0.424
	HDL (mg/ dl)	0.048	0.858
	LDL (mg/ dl)	0.045	0.581
	Triglyceride (mg/ dl)	0.008	0.860
	Kontrollen	1.141	<0.001

### Vergleich der DCP-Zahl im peripheren Blut von CKD 3-Patienten mit versus ohne bisherige CVE

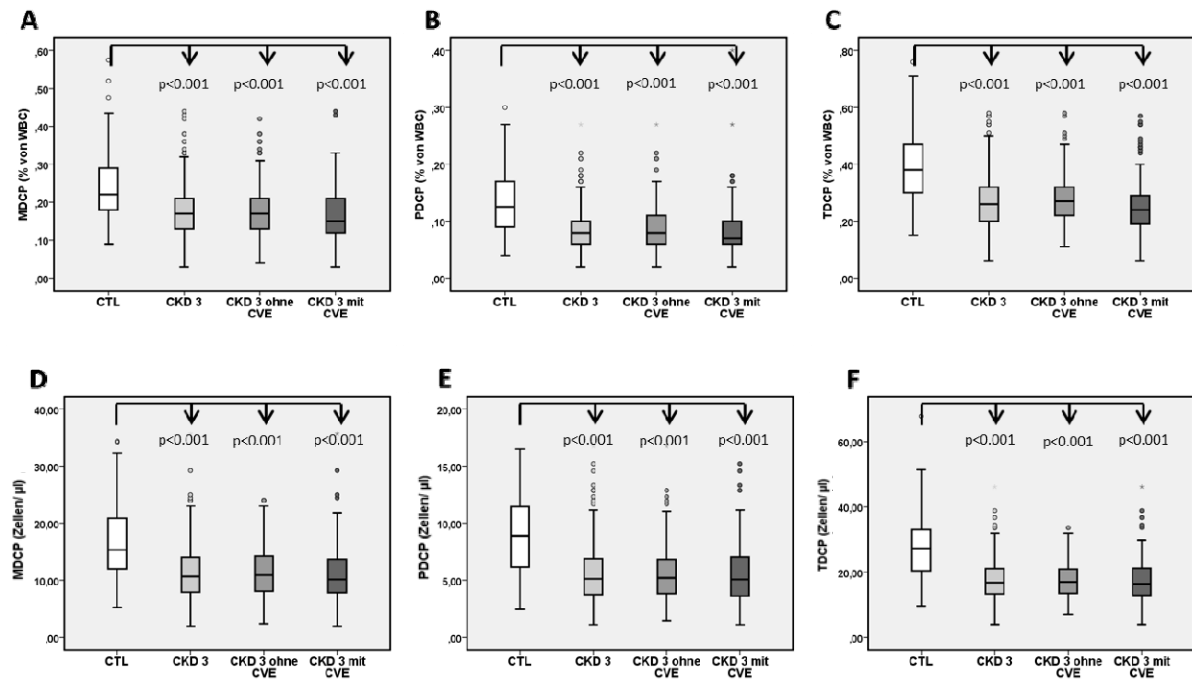
Die Anzahl der zirkulierenden DCP von CKD 3-Patienten mit und ohne bisherige CVE sind in Tabelle 5 und Abbildung 11 dargestellt. Im Vergleich zu den koronar gesunden Kontrollen sind die relativen und absoluten DCP-Zahlen bei den CKD 3-Patienten mit und ohne Vorgeschichte von CVE signifikant erniedrigt (Tabelle 5, jeweils  $p < 0.001$ ).

Die relativen und absoluten mDCP-Zahlen als auch die absolute pDCP-Zahl sind lediglich tendenziell niedriger bei CKD 3-Patienten mit bisherigen CVE im Vergleich zu denen ohne CVE. Eine signifikante Reduktion der relativen pDCP- (Abbildung 11 B,  $p = 0.035$ ) und tDCP-Zahlen (Abbildung 11 C,  $p = 0.013$ ), sowie der absoluten tDCP-Zahl (Abbildung 11 F,  $p = 0.047$ ) konnte bei CKD-Patienten mit einer Vorgeschichte von CVE im Vergleich zu denen ohne bisherige CVE nachgewiesen werden.

**Tabelle 5      Anzahl zirkulierender DCP bei CKD 3-Patienten mit und ohne bisherige CVE**

	<b>CKD 3-Patienten ohne CVE (n=165)</b>	<b>CKD 3-Patienten mit CVE (n=122)</b>	<b>P-Wert<sup>1</sup></b>
<b>mDCP rel. (% von WBC)</b>	0.17 (0.04, 0.42) 0.18 ± 0.07	0.15 (0.03, 0.44) 0.17 ± 0.07	ns
<b>pDCP rel. (% von WBC)</b>	0.08 (0.02, 0.27) 0.09 ± 0.04	0.07 (0.02, 0.40) 0.08 ± 0.05	0.035
<b>tDCP rel. (% von WBC)</b>	0.27 (0.11, 0.58) 0.28 ± 0.09	0.24 (0.06, 0.57) 0.26 ± 0.10	0.013
<b>mDCP abs. (Zellen/ µl)</b>	10.9 (2.3, 24.0) 11.3 ± 4.2	10.1 (1.9, 35.6) 11.2 ± 5.2	ns
<b>pDCP abs. (Zellen/ µl)</b>	5.2 (1.4, 16.7) 5.6 ± 2.5	5.1 (1.1, 15.2) 5.6 ± 2.8	ns
<b>tDCP abs. (Zellen/ µl)</b>	17.0 (7.0, 33.6) 17.5 ± 5.3	16.4 (3.8, 46.2) 17.4 ± 7.0	0.047

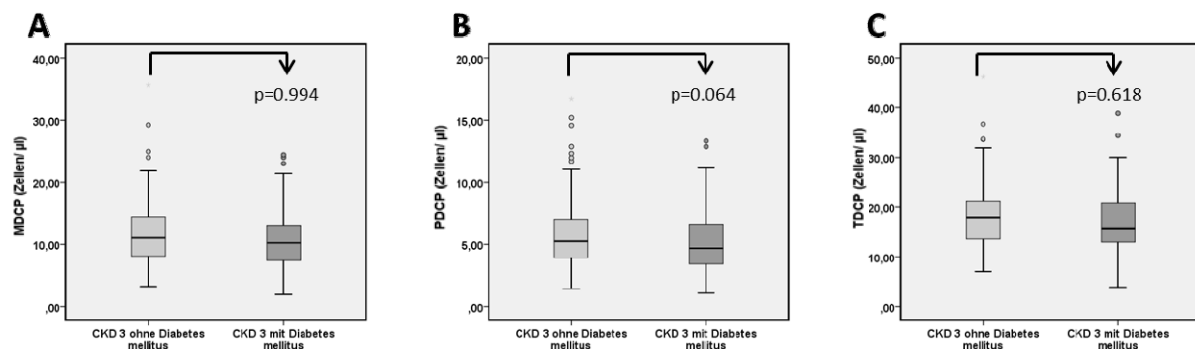
<sup>1</sup> CKD 3-Patienten ohne bisherigen CVE im Vergleich zu CKD 3-Patienten mit bisherigen CVE nach entsprechendem T-Test oder Mann-Whitney-Test



**Abbildung 11** Relative und absolute Zellzahlen von zirkulierenden mDCP, pDCP und tDCP bei Kontrollen (n=85) und CKD 3-Patienten (n=287), sowie CKD 3-Patienten ohne bisherige CVE (n=165) vs. mit bisherigen CVE (n=122)

### Vergleich der Anzahl von DCP im peripheren Blut von CKD 3-Patienten mit versus ohne Diabetes mellitus

Die absoluten Zellzahlen von CKD 3-Patienten mit und ohne Diabetes mellitus wurden verglichen. CKD 3-Patienten mit und ohne Diabetes mellitus wiesen hinsichtlich der mDCP-, der pDCP- und der tDCP-Zahl keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 12).

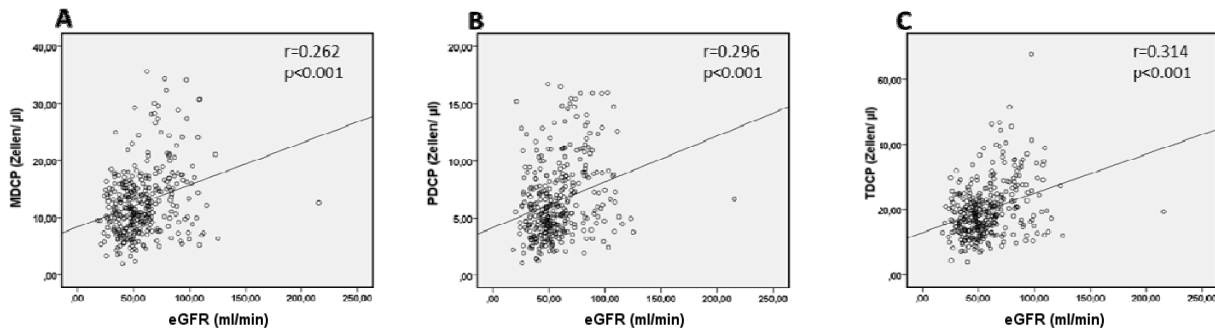


**Abbildung 12** Absolute mDCP-, pDCP-, und tDCP-Zahlen bei CKD 3-Patienten mit (n=112) und ohne (n=175) Diabetes mellitus



#### 5.4 Zirkulierende dendritische Präkursorzellen und glomeruläre Filtrationsrate bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3

Die Anzahl zirkulierender DCP von Kontrollen und CKD 3-Patienten war mit der GFR positiv korreliert (Abbildung 13). Mit abnehmender Nierenfunktion fanden sich niedrigere DCP-Zahlen (jeweils  $p < 0.001$ ).

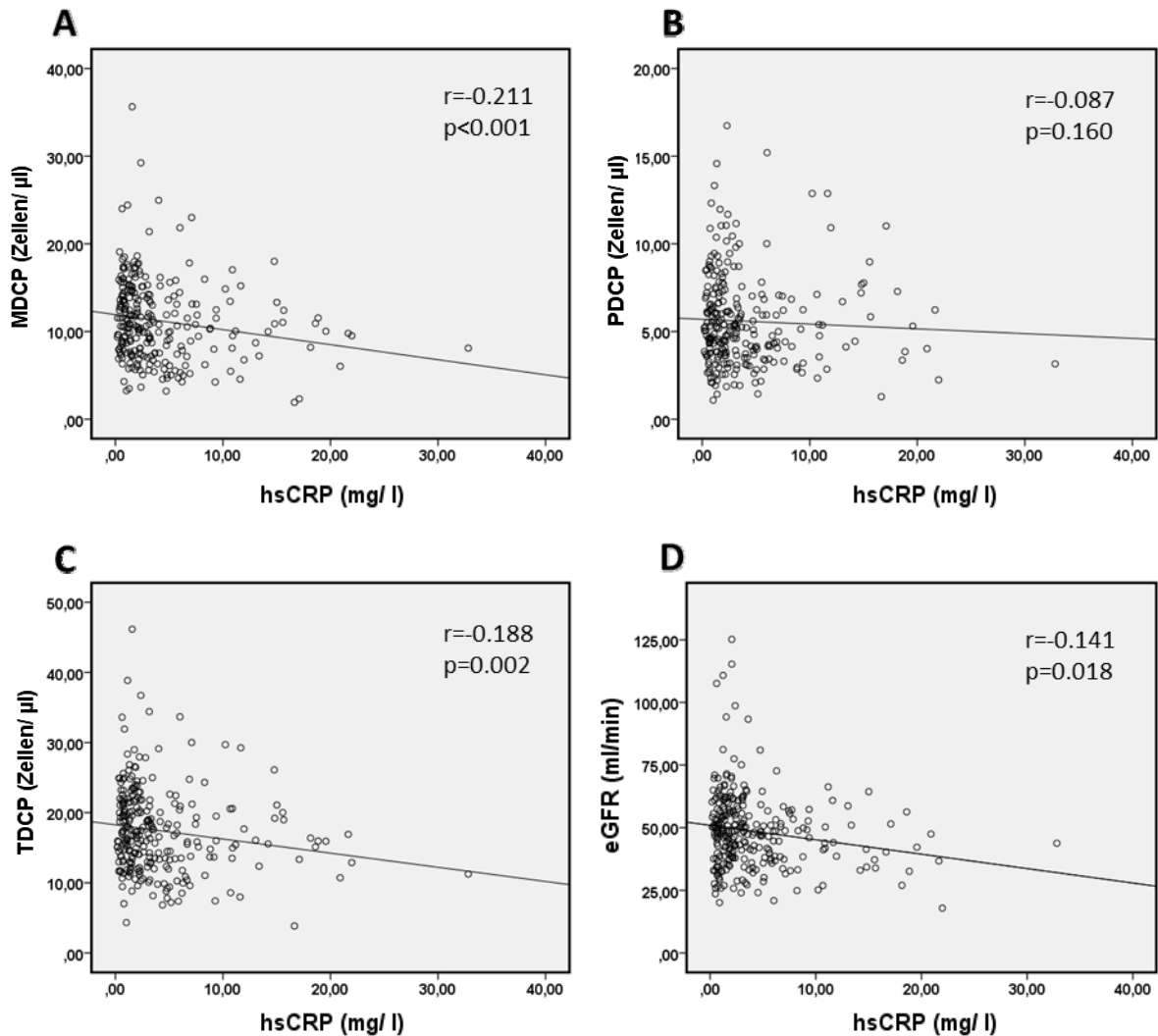


**Abbildung 13** Korrelation der absoluten zirkulierenden mDCP-, pDCP- und tDCP-Zellzahlen mit der eGFR (ml/ min) bei koronar gesunden Kontrollen (n=85) und CKD 3-Patienten (n=287)

#### 5.5 C-reaktives Protein, Anzahl zirkulierender dendritischer Präkursorzellen und glomeruläre Filtrationsrate bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3

Die Anzahl zirkulierender DCP sowie die eGFR von CKD 3-Patienten wurden mit dem hsCRP korreliert (Abbildung 14). Es fand sich eine signifikant negative Korrelation von mDCP (Abbildung 14 A,  $r = -0.211$ ,  $p < 0.001$ ), pDCP (Abbildung 14 B,  $r = -0.087$ ,  $p = 0.160$ ) und tDCP (Abbildung 14 C,  $r = -0.188$ ,  $p = 0.018$ ) mit hsCRP.

Der hsCRP-Wert korreliert zudem negativ mit der eGFR (Abbildung 14 D,  $r = -0.141$ ,  $p = 0.018$ ). Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen hsCRP und der IL-6-Konzentration nachgewiesen werden.



**Abbildung 14** Korrelation der absoluten zirkulierenden mDCP-, pDCP- und tDCP-Zellzahlen, sowie der eGFR mit der gemessenen hsCRP-Konzentration (mg/l) bei CKD 3-Patienten (n=287)

## 5.6 Zytokinkonzentrationen im Plasma bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3

CKD 3-Patienten wiesen signifikant höhere IL-6- (Abbildung 15 A,  $p=0.036$ ), TNF- $\alpha$ - (Abbildung 15 B,  $p=0.021$ ) und IL-10-Konzentrationen (Abbildung 15 C,  $p<0.001$ ) im Vergleich zu den koronar gesunden Kontrollen auf (Tabelle 6, Abbildung 15).

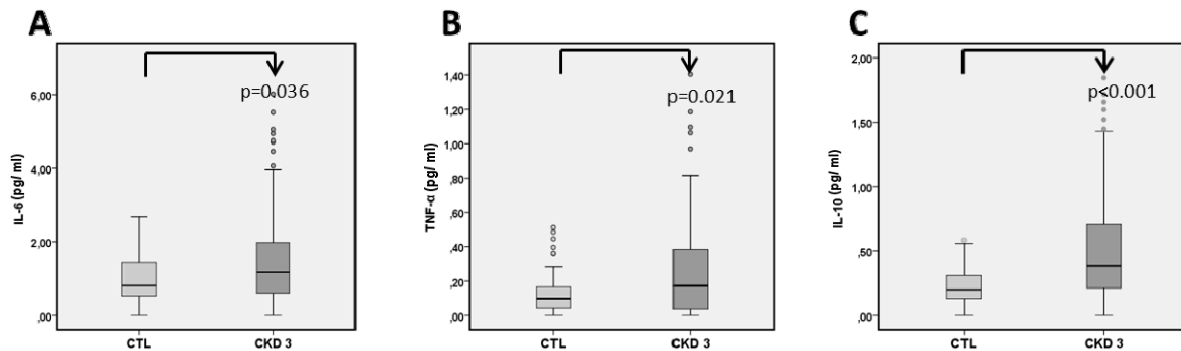
IL-6-, TNF- $\alpha$ - und IL-10- Plasmakonzentrationen korrelieren nicht mit jeglichen DCP-Zahlen.

**Tabelle 6 Plasma-Zytokin-Konzentrationen der CKD 3- und Kontrollpatienten**

	Kontrollen (n=85)	CKD 3-Patienten (n=287)	P-Wert <sup>1</sup>
IL-6 (pg/ ml)*	0.82 (0.00, 7.32) 1.34 $\pm$ 1.42	1.36 (0.00, 28.18) 2.08 $\pm$ 2.95	0.036
IL-10 (pg/ ml)*	0.20 (0.00, 1.15) 0.30 $\pm$ 0.30	0.40 (0.00, 9.44) 0.62 $\pm$ 1.00	<0.001
TNF- $\alpha$ (pg/ ml)*	0.10 (0.00, 0.51) 0.14 $\pm$ 0.14	0.19 (0.00, 11.89) 0.42 $\pm$ 1.04	0.021

<sup>1</sup> CKD 3-Patienten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten

\* gemessen bei 41 Kontrollpatienten und 208 CKD 3-Patienten  
nach entsprechendem T-Test oder Mann-Whitney-Test



**Abbildung 15 Plasma-Konzentrationen von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 bei CKD 3-Patienten (n=208) und Kontrollen (n=41)**

### 5.7 Vitamin D-Status und Anzahl zirkulierender dendritischer Präkursorzellen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3

Aufgrund der DCP-Erniedrigung bei CKD wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Vitamin D-Mangel eine Ursache dafür sein könnte. Die 25(OH)- bzw. die 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Konzentration im Plasma wurde bei 272 bzw. 186 CKD 3-Patienten gemessen (Tabelle 7). CKD 3-Patienten wiesen im Mittel eine 25(OH)-Vitamin D-Konzentration von 18.1 ng/ ml auf, was auf eine insuffiziente Versorgung, gemäß der Richtlinien des Institute of Medicine 2010 (Vitamin D-Mangel: 12-30 ng/ ml), hindeutet.

Die gemessene 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Konzentration liegt mit im Mittel bei 33.6 ng/ l im Normbereich von 16-70 ng/ l (Institute of Medicine 2010).

Geschlechterspezifisch konnten keine signifikanten Unterschiede bei den CKD 3-Patienten detektiert werden.

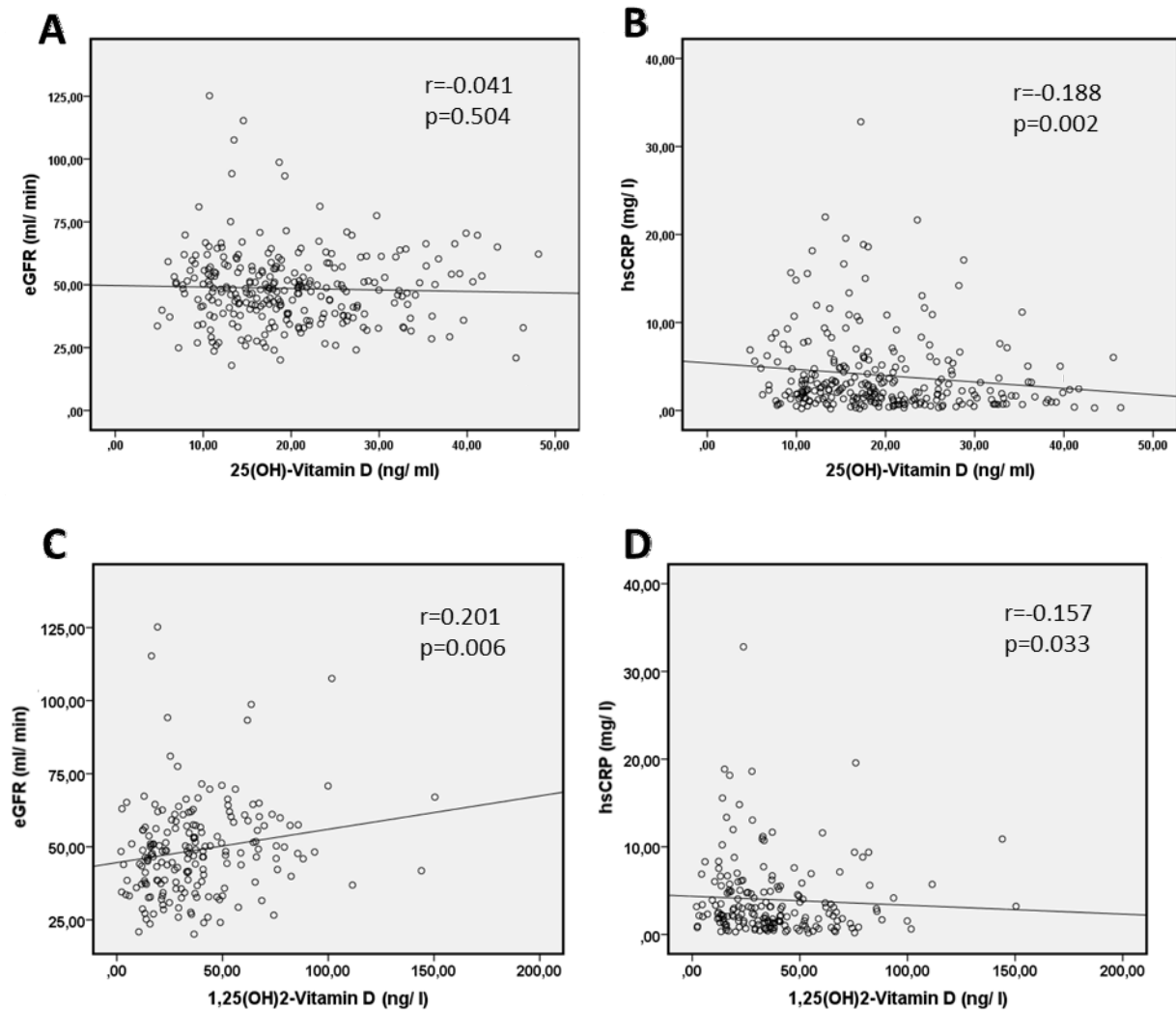
Sowohl die absoluten als auch die relativen Anzahlen von mDCP, pDCP und tDCP korrelierten nicht mit den Konzentrationen von 25(OH)- und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D.

Dafür ergab sich eine inverse Korrelation für 25(OH)-Vitamin D mit hsCRP (Abbildung 16 B,  $r=-0.188$ ,  $p=0.002$ ) und eine positive Korrelation für die eGFR mit 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D (Abbildung 16 C,  $r=0.201$ ,  $p=0.006$ ).

**Tabelle 7 Vitamin D-Konzentrationen bei CKD 3-Patienten**

	<b>CKD 3-Patienten (n=287)</b>
25(OH)-Vitamin D (ng/ ml) <sup>#</sup>	18.1 (4.8, 48.2) 19.7 ± 18.7
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D (ng/ l) <sup>#</sup>	33.6 (2.0, 150.4) 37.9 ± 25.1

<sup>#</sup> 25(OH)-Vitamin D gemessen bei 272 CKD 3-Patienten, 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D gemessen bei 186 CKD 3-Patienten



**Abbildung 16** Korrelation der eGFR und der gemessenen hsCRP-Werte mit der 25(OH)-Vitamin D- (n=272) und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D- (n=186) Konzentration bei CKD 3-Patienten

Zur weiteren Bearbeitung der Hypothese, ob ein Vitamin D-Mangel eine Reduktion der zirkulierenden DC-Zahl bedingt, wurden die CKD 3-Patienten hinsichtlich ihres Vitamin D-Status eingeteilt (Tabelle 8). Patienten mit Vitamin D-Defizienz wiesen tendenziell nur leicht erniedrigte absolute mDCP-Zahlen auf. PDCP- und tDCP-Zahlen waren zudem tendenziell leicht erhöht im Vergleich zu CKD 3-Patienten mit suffizientem Vitamin D-Status. Die eGFR unterschied sich zwischen den Gruppen ebenso nicht signifikant. Lediglich die CRP-Werte reduzieren sich leicht signifikant mit zunehmender 25(OH)-Vitamin D-Konzentration ( $p = 0.048$ ).

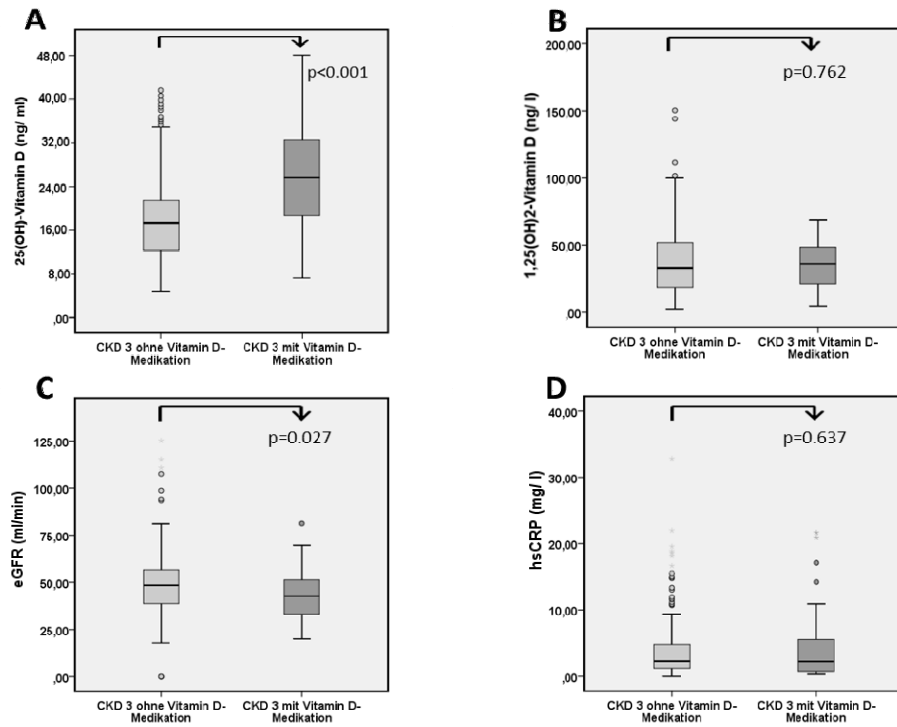
**Tabelle 8** Einteilung der CKD 3-Patienten hinsichtlich ihres Vitamin D-Status

	<b>CKD 3 mit 25(OH)-Vitamin D- Defizienz (n=26)</b>	<b>CKD 3 mit 25(OH)-Vitamin D- Insuffizienz (n=138)</b>	<b>CKD 3 mit 25(OH)-Vitamin D- Suffizienz (n=112)</b>	<b>P- Wert<sup>1</sup></b>
25(OH)-Vitamin D- Bereich <sup>*</sup>	< 12 ng/ ml	12 - 30 ng/ ml	≥ 30 ng/ ml	-
mDCP	10.43 (3.24, 35.64) 11.45 ± 5.49	10.60 (1.92, 24.00) 11.03 ± 4.20	10.83 (4.69, 29.24) 11.47 ± 4.66	ns
pDCP	4.81 (1.08, 16.74) 5.55 ± 3.07	5.22 (1.28, 12.87) 5.65 ± 2.50	4.69 (1.86, 15.20) 5.44 ± 2.62	ns
tDCP	17.16 (4.32, 46.17) 17.71 ± 7.14	16.38 (3.84, 34.41) 17.30 ± 5.80	16.74 (9.40, 36.72) 17.42 ± 5.37	ns
eGFR	50.18 (23.57, 125.17) 49.28 ± 16.12	47.33 (17.89, 115.34) 48.19 ± 14.75	50.46 (20.86, 70.54) 49.20 ± 13.14	ns
hsCRP	2.62 (0.22, 18.15) 4.31 ± 4.14	2.38 (0.18, 32.81) 4.18 ± 4.87	1.61 (0.29, 11.17) 2.46 ± 2.38	0.048

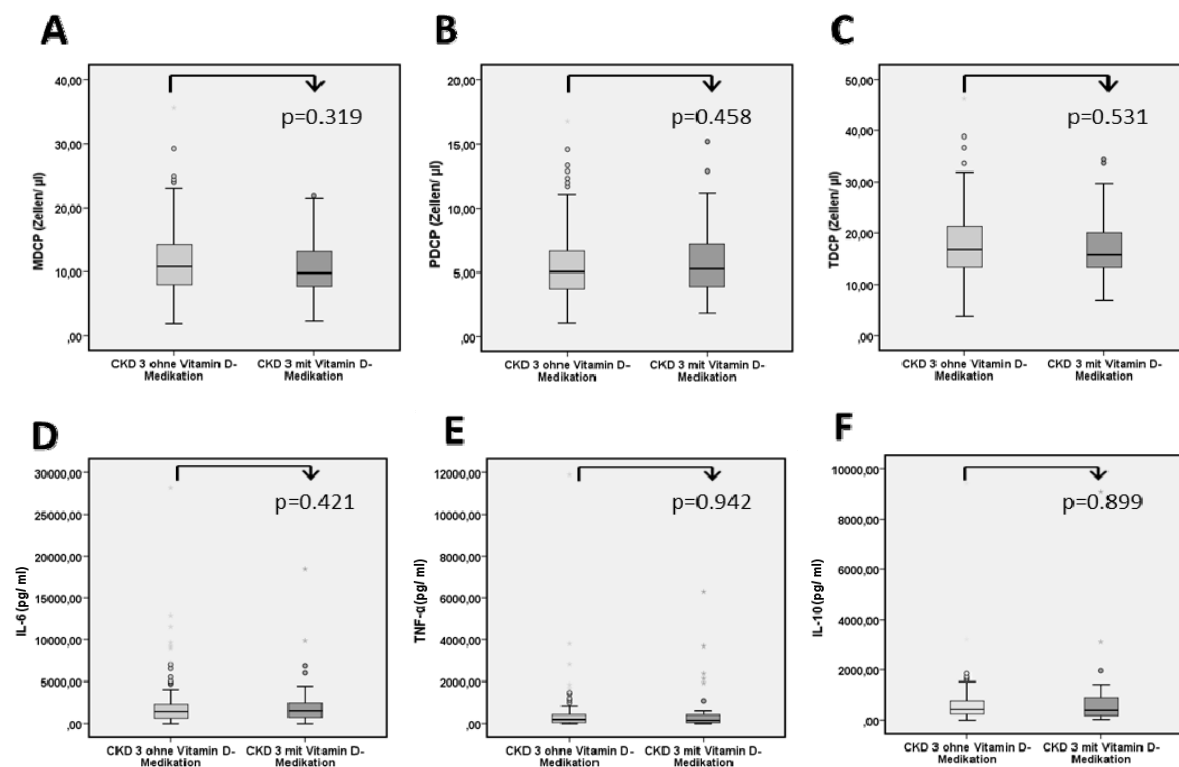
<sup>1</sup> für den Unterschied zwischen allen Gruppen nach Kruskal-Wallis-Test<sup>\*</sup> Normwert-Bereiche für 25(OH)-Vitamin D nach den Richtlinien des Institute of Medicine 2010

Weiterhin wurden die CKD 3-Patienten in zwei Gruppen eingeteilt. Ausgehend vom ermittelten Median der tDCP-Zahl der CKD 3-Patienten wurde der 25(OH)-Vitamin D- und der 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Status von CKD 3-Patienten mit niedrigen Zellzahlen bzw. hohen Zellzahlen ermittelt. Es konnte zwischen den beiden untersuchten Gruppen kein signifikanter Zusammenhang zwischen tDCP-Zahl und 25(OH)-Vitamin D- bzw. 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Status detektiert werden.

Einundsechzig der 287 untersuchten CKD 3-Patienten (21.3 %) nahmen Vitamin D-Präparate ein. Patienten mit Vitamin D-Supplementation hatten eine signifikant höhere 25(OH)-Vitamin D- (Abbildung 17 A,  $p < 0.001$ ), jedoch keine erhöhte 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D- Plasmakonzentration (Abbildung 17 B,  $p = \text{ns}$ ) im Vergleich zu CKD 3-Patienten ohne Vitamin D-Supplementation. Patienten ohne Vitamin D-Medikation wiesen eine signifikant höhere eGFR auf im Vergleich zu den Patienten mit Vitamin D-Medikation (Abbildung 17 C,  $p = 0.027$ ). Die hsCRP-Werte unterschieden sich nicht (Abbildung 17 D,  $p = \text{ns}$ ). Beim Vergleich der absoluten DCP-Zahlen und der Zytokinkonzentration konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen CKD 3-Patienten mit und ohne Vitamin D-Medikation beobachtet werden (Abbildung 18).



**Abbildung 17** Vergleich der 25(OH)-Vitamin D-Konzentrationen (A, n=272), 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Konzentrationen (B, n=186), der eGFR (C, n=287) und der hsCRP-Werte (D, n=287) bei CKD 3-Patienten mit (n=61) und ohne (n=226) Vitamin D-Medikation



**Abbildung 18** Vergleich der absoluten mDCP (A, n=287), pDCP (B, n=287), tDCP (C, n=287), IL-6- (D, n=208), TNF-α- (E, n=208) sowie IL-10-Konzentrationen (F, n=208) bei CKD 3-Patienten mit (n=61) und ohne (n=226) Vitamin D-Medikation



## 6. Diskussion

### 6.1 *Chronische Niereninsuffizienz, kardiovaskuläres Risiko und Atherosklerose*

Chronische Nierenerkrankung ist mit einer hohen Prävalenz von CV Risikofaktoren assoziiert und stellt zudem einen wichtigen eigenständigen CV Risikofaktor dar. Unabhängig vom Stadium der CKD ist das Risiko für CVE in dieser Patientengruppe signifikant erhöht (Di Angelantonio et al. 2010, Hage et al. 2009). Im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollpersonen mit normaler Nierenfunktion weisen CKD Patienten eine deutlich höhere CV Mortalität auf (Tesar 2003). Patienten mit ESRD weisen dabei das größte Risiko für CVE auf (Hage et al. 2009). Fünfzig bis 60 % der CKD Patienten erreichen die terminale Niereninsuffizienz aufgrund eines frühzeitigen Todes durch CVE nicht (Wright und Hutchison 2009, K/DOQI 2005). Die Mortalitätsrate und die CV Ereignisrate steigen mit sinkender GFR  $<60 \text{ ml/min/1.73m}^2$  (K/DOQI 2005).

Aufgrund dessen ist das CV Risikoprofil von Patienten mit CKD von besonderer Bedeutung. Die Verbesserung der Prävention von CV Erkrankungen unterstreicht die Bedeutung der Suche nach neuen CV Risikofaktoren und Biomarkern (Wright und Hutchison 2009), welche das individuelle Risiko besser beschreiben.

Die Folgen der Niereninsuffizienz für das Gefäßsystem werden unter anderem durch das Immunsystem vermittelt, welches den urämischen Status als Zustand chronischer Inflammation ansieht. Urämiotoxine bestehen aus heterogenen Substanzen mit pro-inflammatorischen Effekten. Urämiebedingte Akkumulation von Toxinen ist ein chronischer Stimulus für die inflammatorische Antwort (Kato et al. 2008). Vaskuläre Veränderungen, welche den Prozess der Atherosklerose charakterisieren, werden initiiert und aufrecht erhalten durch die Interaktion von Immunzellen und Zellen der Gefäßwand. Vaskuläre inflammatorische Antworten durch chemotaktische und haptotaktische Wege, fördern nicht nur das Wachstum und die Ausdehnung von frühen atherosklerotischen Läsionen, sie spielen ebenfalls eine Rolle bei der Plaquestabilisierung (Libby et al. 2002).

Hauptrisikofaktoren von CVD wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie und Rauchen sind auch bei CKD-Patienten obligat. Hinzu kommen weitere Faktoren wie Aspekte des Lebensstils, zum Beispiel Übergewicht

oder Alkoholkonsum (Wright und Hutchison 2009, Stinghen et al. 2010). Hinweise auf erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmarkern im Blut und somit ein aktiviertes Immunsystem kann man schon in frühen Stadien der CKD beobachten (Stinghen et al. 2010). Diese Risikofaktoren begünstigen u. a. die Entwicklung der Atherosklerose in den Gefäßen.

Die Präsenz von DC in prä-atherosklerotischen Arterien und die Akkumulation von DC in atherosklerotischen Plaques wurde bereits 1998 von *Bobryshev und Lord* nachgewiesen. Ihre Beteiligung an der Formation atherosklerotischer Läsionen konnte erst später beschrieben werden (Bobryshev 2000). DC spielen ebenso eine wichtige Rolle bei der Plaquestabilisierung, was einen bedeutenden Risikofaktor für das Auftreten von CVE wie Myokardinfarkt und Schlaganfall infolge Plaqueruptur in koronaren Gefäßen bzw. in der Halsschlagader darstellt (Yilmaz et al. 2004). Die DCP-Zahl in verschiedenen Kompartimenten könnte daher einen möglichen Risikofaktor und Marker für solche Akutereignisse darstellen. Des Weiteren könnte die Progression der Nierenerkrankung mit DCP in Verbindung stehen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Zellzahl von DCP im peripheren Blut bei Patienten mit CKD im Stadium 3 evaluiert. Es wurde eine signifikante Reduktion der zirkulierenden mDCP-, pDCP- sowie tDCP-Zahl bei CKD 3 Patienten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten nachgewiesen. Um den inflammatorischen Status zu erfassen, wurden Messungen der Plasma-Zytokinkonzentrationen von IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  durchgeführt. Der Vitamin D-Status stellt einen weiteren unabhängigen Prädiktor der CV- und Gesamtmortalität (Drechsler et al. 2010) sowie für das Fortschreiten von CKD dar (Liu et al. 2006, Kalkwarf et al. 2012). Vitamin D hat zahlreiche Effekte auf Zellen des Immunsystems. Es inhibiert unter anderem die Differenzierung und Reifung von DC unter Erhalt von unreifen DC, was durch eine verringerte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen gekennzeichnet ist (Piemonti et al. 2000). Eine Beziehung zwischen der DCP-Zahl und dem Vitamin D-Status in CKD 3-Patienten wurde deshalb untersucht.

## 6.2 Zirkulierende dendritische Präkursorzellzahl bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz im Stadium 3

Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse konnte erstmals eine signifikante Reduktion der zirkulierenden DCP bei einer großen Anzahl von Patienten mit geringgradiger CKD, im Stadium 3, detektiert werden. In jeder untersuchten Subpopulation der DCP als auch bei der Gesamtzellzahl besteht eine signifikante Reduktion bei CKD 3-Patienten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollen. Das Ausmaß der Reduktion ist vergleichbar mit Ergebnissen früherer Untersuchungen an KHK-Patienten ohne CKD. Bisher wurden derartige Messungen nur bei kleinen Patientenkohorten und fast ausschließlich bei dialysepflichtigen Patienten durchgeführt.

*Agrawal et al.* konnten bereits im Jahr 2010 eine signifikante Reduktion der pDCP- und tDCP- Zahl bei CKD-Patienten im Stadium 5 im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe feststellen. Im Dialysestadium selbst wiesen die Patienten weiter signifikant sinkende DCP-Zahlen im Vergleich zum Prä-Dialysestadium auf. Die Anzahl der mDCP der Prä-Dialysepatienten und der Dialysepatienten war dabei jedoch stets mit der Kontrollgruppe vergleichbar. Dementsprechend wurde der Unterschied hinsichtlich der Anzahl an tDCP zwischen Kontrollen und ESRD-Patienten durch die signifikante Reduktion der Anzahl an pDCP hervorgerufen. Die Reduktion wurde dabei mit der Möglichkeit der Migration der Zellen ins Gewebe bzw. dem Verlust der Zellen durch die Dialysetherapie erklärt. Im Gegensatz dazu wiesen die hier untersuchten Patienten mit CKD im Stadium 3 auch eine signifikante Reduktion der mDCP auf.

*Lim et al.* (2006) beobachtete tendenziell niedrigere relative pDCP-Werte bei Dialysepatienten (Hämodialyse- und Peritonealdialysepatienten, n=28), nierentransplantierten Patienten (n=52) und CKD-Patienten ohne Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie (n=10, eGFR <50ml/ min) im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe (n=13). Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Die relativen mDCP-Zahlen der CKD-Patienten ohne Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie waren hingegen signifikant erniedrigt im Vergleich zu den relativen mDCP-Zahlen der Dialyse- und nierentransplantierten Patienten, welche zudem tendenziell höher waren als die der Kontrollen. Hier zeigte sich jedoch

ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der relativen mDCP-Zahlen der CKD-Patienten im Stadium 5 und 5D, der Nierentransplantierten und der Kontrollen. Als Erklärung für die erhöhten relativen mDCP-Zahlen führte man das signifikant erhöhte Level des DC mobilisierenden Zytokins Flt3L (fms-like tyrosine kinase 3) in den Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Erhöhte Flt3L-Level könnten demnach als kompensatorische Antwort auf die reduzierte Anzahl von pDCP im Blut verstanden werden und als Stimulus für die vermehrte Produktion von mDCP fungieren.

Im Gegensatz dazu beobachtete *Hesselink et al.* (2005) eine niedrigere Anzahl an DCP bei Hämodialysepatienten im Vergleich zu CKD-Patienten im Prä-Dialysestadium und Kontrollen. Insgesamt wiesen die Kontrollen signifikant höhere Zahlen an DCP als die untersuchten CKD-Patientengruppen auf. Bei Hämodialysepatienten konnte man signifikant niedrigere mDCP-Zahlen im Vergleich zu den CKD-Patienten im Stadium 5 bzw. mit Peritonealdialyse beobachten. Im Vergleich zu den Kontrollpatienten wiesen nur die Dialysepatienten signifikant niedrigere mDCP-Zahlen auf. Die Anzahl an pDCP war unter den CKD-Patientengruppen vergleichbar, Patienten mit Hämodialyse wiesen dabei die niedrigsten Zellzahlen auf. Somit könnte die Reduktion der pDCP und mDCP auf den Verlust der GFR (Vergleich der DCP zwischen gesunden Kontroll- und CKD-Patienten), sowie auf einen weiteren Verlust durch die Dialysebehandlung (Vergleich der mDCP bei Hämodialysepatienten und allen anderen Patientenkohorten) zurückzuführen sein.

Während somit in früheren Analysen überwiegend die Reduktion der mDCP- oder pDCP-Zahl von CKD-Patienten im Vergleich zu Kontrollen beobachtet werden konnte, wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Reduktion der mDCP- als auch der pDCP-Zahl in einem früheren Stadium der Niereninsuffizienz, hier Stadium 3, beobachtet. Eine chronische Niereninsuffizienz scheint somit frühzeitig Einfluss sowohl auf die mDCP- als auch auf die pDCP-Zahl auszuüben.

Die Kontrollgruppe der vorliegenden Arbeit war jünger und bestand zum größeren Teil aus Frauen, was zu den deutlichen Unterschieden hinsichtlich der DCP-Zahlen beitragen könnte. Ein möglicher Einfluss dieser Confounder auf die signifikanten Unterschiede der DCP-Zahlen konnte jedoch durch eine Regressionsanalyse ausgeschlossen werden.

Zur Bewertung potentieller Auswirkungen auf das CV Risiko in Folge einer Veränderung der DCP-Zahl bei Patienten mit gesicherter KHK verschiedener Schweregrade versus Patienten mit CKD 3 mit und ohne CV Vorerkrankung, wurden die DCP-Zahlen beider Patientenkohorten verglichen (Paul et al. 2013). Ausgehend von den Ergebnissen einer Koronarangiografie waren die KHK-Patienten in Patientengruppen verschiedener Schweregrade eingeteilt worden (Yilmaz et al. 2009). Es zeigte sich ein KHK-Schweregrad assoziierter Abfall der DCP-Zahlen. Im Vergleich zu den Patienten mit KHK jeglicher Schweregrade wiesen die hier untersuchten CKD 3-Patienten signifikant erniedrigte absolute mDCP-, pDCP- und tDCP- Zahlen auf (Paul et al. 2013). Die KHK-schweregradabhängige Abnahme der DCP-Zahl unterstreicht den signifikanten Zusammenhang zwischen dem Rückgang der DCP-Zahl und dem Ausmaß der KHK. Da bereits eine signifikante Reduktion von DCP bei CKD 3-Patienten ohne bisherige CVE im Vergleich zu Patienten mit schwerer KHK aber ohne relevante CKD gezeigt werden konnte, deutet dies auf eine DC-medierte CV Risikoerhöhung bei Patienten mit CKD im Stadium 3 hin (Paul et al. 2013).

Bereits bei früheren Untersuchungen konnte eine vergleichbare Reduktion von DCP bei Patienten mit stabiler und instabiler KHK im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten, unabhängig vom Alter, Geschlecht, atherogenen Risikofaktoren bzw. unabhängig von der Medikation, festgestellt werden (Yilmaz et al. 2006, Van Vré et al. 2010). Die signifikante Reduktion der mDCP im peripheren Blut von KHK-Patienten wurde als neue Möglichkeit der Prognoseabschätzung von CVE angesehen, da eine derartige Reduktion zudem bei koronarer Atherosklerose beobachtet wurde (Yilmaz et al. 2006). MDCP sind an entzündlichen Prozessen im Zusammenhang mit Atherosklerose beteiligt, sie kommen in atherosklerotischen Plaques vor, ihre Anzahl erhöht sich in der vaskulären Gefäßwand je nach Stadium der Atherosklerose und sie fördern Plaquestabilisierung (Yilmaz et al. 2004, Kawahara et al. 2007). Im Gegensatz dazu war die Anzahl an pDCP nur leicht erniedrigt, was durch das entsprechend divergente Migrationsverhalten, die unterschiedliche Funktion und Turnover, die verschiedenen Migrationssignale und der unterschiedlichen Rolle beider Untergruppen bei der Atherogenese erklärbar ist (Yilmaz et al. 2006). PDCP sind auf die Modulation der Immunantwort hinsichtlich Stärke, Dauer und Qualität, durch ihre Fähigkeit Zytokine und Chemokine

freizusetzen und Antigene zu präsentieren, spezialisiert. Sie sind jedoch nicht für die Initiierung der Immunantwort erforderlich. Abhängig vom Stimulus reifen pDCP entweder zu immunstimulierenden oder tolerogenen Zellen heran (Colonna et al. 2004).

Dem gegenüber stellten *Van Vré et al.* (2006) sowohl eine signifikante Reduktion der relativen pDCP- als auch der absoluten pDCP-Zahl im peripheren Blut von KHK-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen fest. Die relative aber nicht die absolute mDCP-Zahl war ebenfalls signifikant erniedrigt. Die dabei beobachtete deutlich stärkere Reduktion der pDCP bei ausgedehnter KHK und die weitere Reduktion bei Erhöhung der Anzahl atherosklerotischer Arterien könnte mit einer aktiven Rekrutierung der DC in atherosklerotische Plaques zusammenhängen. Bereits bei früheren Untersuchungen wurde eine Ansammlung von DC in atherosklerotischen Arterien und vulnerablen Plaques im Vergleich zu nicht betroffenen Arterien beschrieben (Bobryshev 2000, Bobryshev 2005). Zudem beobachteten *Yilmaz et al.* (2006) eine Ansammlung von Makrophagen, T-Zellen, Mastzellen und DC in instabilen atherosklerotischen Läsionen. Akute myokardiale Verletzungen könnten somit die DC-Differenzierung hin zu lokaler und/oder systemischer Zytokinaktivierung triggern.

Während *Van Brussel et al.* (2010) eine signifikante Reduktion der mDCP und pDCP bei Patienten mit stabiler Angina pectoris und gesicherter KHK beobachteten, stellten *Shi et al.* (2007) eine Steigerung der relativen und absoluten Anzahl an mDCP bei Männern mit gesicherter KHK fest. Die Anzahlen an pDCP waren dabei vergleichbar mit denen der Kontrollen. Die widersprüchlichen Ergebnisse bei den aufgeführten Untersuchungen könnten aus den unterschiedlichen Methoden der DCP-Detektion (Gen- vs. Proteinexpression) oder durch unterschiedlich verwendete Detektionsmarker für die DCP-Untergruppen resultieren.

*Kofler et al.* (2011) untersuchten die Reifemarker der DCP im Blut von Patienten mit KHK und stellten eine Herunterregulierung der unreifen DC und eine Hochregulierung reifer DC bei KHK-Patienten im Vergleich zu Kontrollen fest.

Zudem konnte in der vorliegenden Untersuchung gezeigt werden, dass CKD 3-Patienten mit bisherigen CVE tendenziell niedrigere Zellzahlen aufweisen als CKD 3-Patienten ohne bisherige CVE. Dies bestätigt somit Befunde bei Patienten mit versus ohne KHK (*Yilmaz et al.* 2009). Eine Reduktion der zirkulierenden DCP wird von

einer lokalen Steigerung der DC in inflammatorischen Läsionen begleitet, was bedeutet, dass DCP vom Blut in entzündliches Gewebe rekrutiert werden (Wertheimer et al. 2004). Insofern könnte auch bei den hier untersuchten Patienten mit CKD im Stadium 3 die Reduktion der DCP-Zahlen mit einer Erhöhung der DC-Zahl in inflammatorischen Läsionen einhergehen.

Ferner konnten *Hesselink et al.* (2005) eine signifikante Reduktion der pDCP-Zahlen bei ESRD-Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zu Nichtdiabetikern detektieren, was darüber hinaus einen möglichen Einfluss von weiteren Komorbiditäten auf zirkulierende DCP im Blut suggeriert. Bei den Untersuchungen von *Hesselink et al.* (2005) konnte jedoch keine Assoziation zwischen anderen Formen der Komorbidität und der DCP-Zahl nachgewiesen werden. In unserem Krankengut bestand hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den mDCP- und pDCP-Zahlen von Diabetikern und Nichtdiabetikern. Bei den untersuchten CKD 3-Patienten wurde lediglich eine tendenziell erniedrigte pDCP-Zahl bei den Diabetikern im Vergleich zu den Nichtdiabetikern detektiert. Zukünftig sollte der Zusammenhang zwischen der DCP-Zahl im Blut und anderen Formen der Komorbidität untersucht werden.

### 6.3 Zirkulierende dendritische Zellen und Nierenfunktion

Es konnte eine signifikant positive Korrelation der im Blut gemessenen mDCP-, pDCP- und tDCP-Zahl mit der eGFR nachgewiesen werden. Je niedriger der eGFR-Wert der CKD 3-Patienten war, desto niedriger war die DCP-Zahl. Bereits bei früheren Untersuchungen konnte eine signifikante Korrelation zwischen der mDCP-Zahl, jedoch nicht der pDCP-Zahl, mit der eGFR beobachtet werden (Lim et al. 2006). Der Rückgang der Nierenfunktion korreliert demnach mit einer Erniedrigung der DCP-Zahl im Blut.

Die Ursachen dafür sind jedoch noch weitgehend unbekannt, diskutiert wird eine reversible funktionelle Beeinträchtigung der DCP-Bildung als Folge des urämischen Milieus bei beeinträchtigter Nierenfunktion (Lim et al. 2006). Ein negativer Einfluss von urämischem Serum von Hämodialysepatienten auf die DC-Funktion und -Reifung konnte bereits in vitro nachgewiesen werden (Lim et al. 2007). Die DCP-Anzahl verringerte sich dabei ebenso wie es bei früheren Untersuchungen von ESRD-

Patienten beobachtet wurde (Hesselink et al. 2005). Zudem zeigten die in urämischem Serum inkubierten DC erniedrigte Endozytoseaktivität, sowie erhöhte Zytokinproduktion und T-Zell-Proliferation (Lim et al. 2007). Somit könnte die Urämie per se ein Grund für die Reduktion der DCP bereits bei früheren Stadien der CKD sein.

#### 6.4 *Zirkulierende dendritische Zellen und Inflammation*

Entzündungsprozesse sind an der Initiierung, Progression und Instabilität atherosklerotischer Plaques beteiligt und gehen bekanntermaßen mit einem erhöhten Risiko an CVE einher. Erhöhte zirkulierende Entzündungsmarker können daher prädiktiv für CVE sein (Blankenberg et al. 2010). In diesem Zusammenhang wird schon lange eine zentrale Bedeutung des CRP, als unabhängiger Prädiktor für CVE, diskutiert (Ridker et al. 2003). In diversen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass CRP mit CVE assoziiert ist (Blankenberg et al. 2010), insbesondere bei CKD.

Wir konnten eine schwache, aber signifikant negative Korrelation zwischen der gemessenen CRP-Konzentration und der mDCP- und tDCP-Zahl bei CKD 3-Patienten nachweisen. CKD 3-Patienten mit höheren mDCP- und tDCP-Zahlen wiesen demnach niedrigere CRP-Werte auf. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der pDCP-Zahl und dem CRP-Wert detektiert werden. Es scheint somit ein Zusammenhang zwischen Inflammation und DCP-Zahl im Blut zu bestehen.

Der Einfluss von CRP auf zirkulierende DCP konnte bereits bei in-vitro-Untersuchungen dokumentiert werden (Van Vré et al. 2008). Dazu wurden humane, von Monozyten abstammende DCP mit humanem CRP kultiviert. Nach 24 Stunden konnte eine erhöhte Expression von DC-Reifungsmarkern gemessen werden. CRP führte zu einer DC-Aktivierung, was mit einer Reduktion der zirkulierenden DCP einhergeht. Die Aktivierung der DC fiel zudem abhängig von der CRP-Konzentration im Serum aus: mit steigender CRP-Konzentration konnte eine erhöhte Anzahl an DC-Reifungsmarkern nachgewiesen werden. Die aktivierten DC stimulierten wiederum T-Zellen, induzierten eine T-Zell-Antwort und Zytokinproduktion (Van Vré et al. 2008). Eine vergleichbare Aktivierung von mDCP und die damit einhergehende Reduktion der mDCP-Zahl bei erhöhter CRP-Konzentration wurden zudem im Jahr 2007 von



*Frenzel et al. (2007)* detektiert. Die Anzahl der pDCP blieb unbeeinflusst, wie auch bei unserer Untersuchung.

Erhöhte CRP-Konzentrationen im Blut, die bereits vielfach bei Patienten mit CVD oder Atherosklerose nachgewiesen wurden (*Brånén et al. 2004*), dürften somit durch DC perpetuierte inflammatorische und proatherogene Prozesse begünstigen. CRP wurde in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen. Es bindet dort an modifiziertes LDL, aktiviert den klassischen Komplementweg und vermittelt somit unmittelbar CVD (*Yeh 2004, Stenvinkel et al. 2005*). CRP und DC wurden zusammen in humanen atherosklerotischen Plaques detektiert (*Sun et al. 2005*), was auf ein lokales Zusammenspiel hindeutet.

Das Vorhandensein von CKD ist mit erhöhten CRP-Konzentrationen assoziiert (*Fox et al. 2010*). Diese wurden zudem bei Patienten mit ESRD nachgewiesen (*Wanner et al. 2002*). In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass höhere CRP-Konzentrationen mit erhöhtem Risiko für Gesamt- und CV-Mortalität bei Patienten mit CKD im Stadium 3 und 4 einhergehen (*Menon et al. 2005*). ESRD-Patienten mit stark erhöhten CRP-Konzentrationen wiesen ein 2.4fach höheres Risiko hinsichtlich der Gesamtsterblichkeit und ein 1.7fach höheres Risiko für CV-Mortalität im Vergleich zu ESRD-Patienten mit niedrigeren CRP-Konzentrationen auf. Die CRP-Konzentration war somit der stärkste Prädiktor für Mortalität, zusammen mit dem Alter und vorbestehender CVD (*Wanner et al. 2002*). CRP stellt überdies einen unabhängigen Risikofaktor für CVD bei CKD dar (*Oberg et al. 2004, Busch et al. 2004*). Andere Studien belegten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen erhöhter CRP-Konzentration und schlechterer Nierenfunktion bei Patienten mit CKD (*Stuveling et al. 2003, Friedet al. 2004*). Auch in unserer Untersuchung konnte eine signifikant negative Korrelation zwischen der CRP-Konzentration und der eGFR gezeigt werden.

Die Ursachen für den Zusammenhang zwischen Niereninsuffizienz und erhöhten CRP-Konzentrationen sind am ehesten in der chronischen Inflammation zu sehen. Erhöhte CRP-Konzentrationen begünstigen zudem endotheliale Dysfunktion, Atherosklerose und glomeruläre Schädigung, was einen Abfall der Nierenfunktion induziert. Entzündungshemmende Therapien zeigten zudem positive Effekte bei der Erhaltung der Nierenfunktion (*Lin et al. 2002*).

### 6.5 Chronische Niereninsuffizienz, Inflammation und Zytokine

Erhöhte Konzentrationen von Entzündungsmarkern wurden bereits in früheren Untersuchungen im Blut von CKD-Patienten nachgewiesen. Mit der Progression der Nierenfunktionseinschränkung nimmt die Konzentration an Entzündungsmarkern zu (Fried et al. 2009). Besonders ESRD-Patienten weisen ein erhöhtes Inflamationsrisiko, nicht nur durch Dialyse-bedingte Faktoren, auf. Eine bei CKD-Patienten gestörte Immunantwort in Verbindung mit einer kontinuierlichen Immunstimulation könnte für die chronische Entzündung und veränderte Zytokinbalancen verantwortlich sein. Eine Vielzahl pro- und antiinflammatorischer Zytokine sind involviert. Die Zytokine IL-10, IL-6 sowie der TNF- $\alpha$  sind bei der Entstehung eines T-Helferzell1/ 2-Ungleichgewichts beteiligt und somit für die Pathogenese von CVD im urämischen Milieu von Bedeutung (Stenvinkel et al. 2005). DC besitzen eine etwa 1000fach höhere Kapazität für die Bildung inflammatorischer Zytokine als andere Leukozyten (Brånén et al. 2004). In der vorliegenden Untersuchung im Blut konnte jedoch keine Assoziation der relativen und absoluten DCP-Zahlen mit den Plasma-Zytokin-Konzentrationen nachgewiesen werden.

Die Sekretion von IL-10 erfolgt verzögert als Reaktion auf erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Faktoren (z. B. Katecholamine und TNF- $\alpha$ ), um begrenzend und hemmend auf die vorherrschenden Entzündungsreaktionen zu wirken. Eine Erhöhung der IL-10-Produktion geht demnach mit Entzündungsreaktionen einher (Meisel et al. 1996). IL-10 reguliert nicht nur proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , sondern reduziert darüber hinaus die Produktion chemotaktischer Faktoren, welche weitere Leukozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens anlocken und die Immunreaktion verstärken (Olszyna et al. 2000). Die Expression von MHC-Klasse-II Molekülen und Adhäsionsmolekülen, welche für die Interaktion zwischen Monozyten und Lymphozyten während der Immunaktivierung verantwortlich sind, wird ebenfalls reguliert (De Waal Malefyt et al. 1991). Als antiatherogener Faktor inhibiert er zusätzlich die Bindung zirkulierender Immunzellen ans Endothelium (Song et al. 1997) und reduziert die Produktion lytischer Enzyme, die zur Plaquestabilisierung beitragen (Kuga et al. 1996). Die meisten dieser

antiinflammatorischen Effekte spielen sich in der Gefäßwand ab, so dass diese nicht über die Bestimmung von zirkulierendem IL-10 detektiert werden können.

Bei den untersuchten CKD-Patienten im Stadium 3 konnten bereits signifikant erhöhte Level von IL-10 im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass bereits bei Patienten in frühen Stadien der CKD, hier im Stadium 3, die Konzentrationen proinflammatorischer Faktoren im Blut erhöht sind und vermehrt Entzündungsreaktionen stattfinden. Weiterhin ist die Halbwertszeit von IL-10 bei CKD-Patienten möglicherweise durch eine erniedrigte Clearance infolge gestörter glomerulärer Filtration oder verändertem tubulärem Metabolismus deutlich erhöht, was die erhöhten Plasmakonzentrationen von IL-10 erklären könnte (Morita et al. 1997). Die Bildung von IL-10 wird zudem bei der Urämie begünstigt, als Konsequenz der chronischen Monozytenaktivierung bei urämischen Patienten (Brunet et al. 1998).

Bei den untersuchten CKD 3-Patienten wurde im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollpatienten eine signifikante Erhöhung der IL-6-Konzentration detektiert. Dies bestätigt frühere Untersuchungen wonach ebenfalls erhöhte IL-6-Konzentrationen im Blut bei CKD-Patienten nachgewiesen werden konnten (Cheung et al. 2000). IL-6 hat sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte (Cheung et al. 2000).

Frühere Studien an ESRD-Patienten haben gezeigt, dass die Serum-Kreatininkonzentration ein bestimmender Faktor für das Plasma-IL-6-Level ist (Bolton et al. 2001, Fried et al. 2009). Eine verminderte Nierenfunktion geht demnach mit erhöhten IL-6-Konzentrationen einher. Erhöhte Plasma IL-6-Konzentrationen sind weiterhin mit erhöhter Mortalität und einer schlechten Prognose bei ESRD assoziiert (Pecoits-Filho et al. 2002). Die proatherogenen Eigenschaften von IL-6 werden durch den Zusammenhang zwischen erhöhter IL-6-Konzentration und Atherosklerose der Arteria carotis bei Patienten mit ESRD deutlich (Stenvijinkel et al. 2002.)

IL-6 fördert ferner die Produktion von CRP (Venugopal et al. 2002). Eine signifikante Korrelation zwischen den gemessenen CRP- und IL-6-Konzentrationen bei den untersuchten CKD 3-Patienten konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. In früheren Studien bestimmte das Level an IL-6 die Gesamt- und CV-Mortalität (Barreto et al. 2010).

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin. Eine Verschlechterung der Nierenfunktion ist einer der wichtigsten Faktoren für die signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Aktivität bei Urämie (Nakanishi et al. 1994).

Bei den untersuchten CKD 3-Patienten konnten im Vergleich zu koronar gesunden Kontrollen signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen beobachtet werden, was die Ergebnisse früherer Studien bestätigt. Bereits 1995 konnte eine signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration bei Patienten mit CKD im Stadium 3 im Vergleich zu Patienten mit CKD Stadium 1-2 und zu Kontrollen nachgewiesen werden (Descamps-Latscha et al. 1995). CKD 5-Patienten wiesen signifikant höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Vergleich zu CKD 3-Patienten auf. Die Erhöhung der Plasmakonzentrationen geht demnach mit der Progression der Niereninsuffizienz einher (Descamps-Latscha et al. 1995).

Zusammenhänge zwischen renaler Funktion und TNF- $\alpha$  wurden bei Patienten mit verschiedenen Graden der Nierenfunktionsstörung aufgezeigt (Descamps-Latscha et al. 1995, Spoto et al. 2011). Die TNF- $\alpha$ -Konzentration korrelierte demnach signifikant invers mit der eGFR. Ab einer eGFR <81 ml/ min konnte eine TNF- $\alpha$ -Akkumulation detektiert werden. Die Konzentration von TNF- $\alpha$  erhöhte sich bei sinkender eGFR weiter. Patienten mit ESRD wiesen demzufolge die höchsten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen auf, was die Bedeutung der Nierenfunktion für die TNF- $\alpha$ -Clearance verdeutlicht (Spoto et al. 2011). Die TNF- $\alpha$ -Konzentration könnte damit ein Marker für eine reduzierte renale Clearance und ein möglicher Indikator für die Schwere der systemischen Inflammation bei CKD sein.

*Roubicek et al.* (2009) und *Agrawal et al.* (2010) konnten bereits im Jahr 2009 eine signifikante Erhöhung der Serumkonzentration proinflammatorischer Zytokine bei ESRD-Patienten feststellen. Bei den damals untersuchten Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz konnte eine vierfach erhöhte CRP- und TNF- $\alpha$ -Serumkonzentration und eine zweifach erhöhte IL-6-Serumkonzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollen detektiert werden. Ursache für die signifikante Erhöhung ist wahrscheinlich die Kombination aus einer erhöhten systemischen Zytokinproduktion in Folge subklinischer Entzündungsreaktionen und die zunehmende Verschlechterung der Nierenfunktion (Roubicek et al. 2009). Auch *Spoto et al.* (2011) konnten eine signifikante Erhöhung der Plasma-Zytokin-

Konzentration bei CKD-Patienten feststellen. Bei dieser Untersuchung wurde eine signifikant erhöhte IL-6-Konzentration bei Patienten mit geringer bzw. moderater (Stadium 2-3 CKD) und schwerer Nierenfunktionsstörung (Stadium 4-5 CKD) im Vergleich zu gesunden Kontrollen und unabhängig von der eGFR nachgewiesen. Die Plasma-IL-6-Konzentration ist demnach bereits bei geringgradiger Nierenfunktionsstörung deutlich erhöht; ein weiterer Anstieg mit Progression der Nierenfunktionsstörung konnte nicht detektiert werden (Spoto et al. 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikant höhere Plasma-IL-6-Konzentration bei Patienten mit CKD im Stadium 3 im Vergleich zu Kontrollen detektiert werden. Eine Erhöhung der IL-6-Konzentration bei CKD repräsentiert damit eine frühzeitige Antwort auf renale Funktionsstörungen.

Die Produktion proinflammatorischer Zytokine ist zudem bei Patienten mit Übergewicht und/ oder CVD erhöht und ist an der Entstehung von Atherosklerose, Insulinresistenz und anderer Pathologien beteiligt (Mc Ternan et al. 2002). Bei ESRD-Patienten wurde zudem eine leichte, aber signifikante Verbindung zwischen der TNF- $\alpha$ -Konzentration und dem Vorhandensein von Karotis-Plaques gezeigt (Stenvinkel et al. 1999).

## 6.6 Chronische Niereninsuffizienz und Vitamin D

Die untersuchten CKD 3-Patienten wiesen mehrheitlich eine deutliche 25(OH)-Vitamin D-Insuffizienz auf. Dabei wiesen rund 9 % der CKD 3-Patienten einen defizienten Vitamin D-Status auf. Die 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Plasmakonzentrationen befanden sich im Mittel im Normbereich. Es fand sich aber eine positive Korrelation der 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Spiegel mit der eGFR.

CKD-Patienten in den Stadien 3 bis 5 besitzen eine hohe Prävalenz für eine Mangelversorgung mit nativem Vitamin D. Eine verordnete Diät bzw. der Verlust des Appetits durch die Urämie könnten Ursachen für den Defizit an 25(OH)-Vitamin D sein (Echida et al. 2011). Eine Hauptursache ist der gestörte Vitamin D-Metabolismus bei CKD, welcher eine reduzierte Vitamin D-Synthese in der Haut, eine reduzierte  $\alpha$ -Hydroxylierung sowie einen Verlust der Metabolite über den Urin beinhaltet (Mehrotra et al. 2008). Weiterhin wirkt sich das urämische Milieu negativ

auf die Bindung des VDR an spezifische DNA-Abschnitte aus und führt zu einer verminderten biologischen Aktivität von  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D (Valdivielso 2009).

Aufgrund des positiven Einflusses von Vitamin D-Analoga auf Proteinurie, Blutdruck und Entzündungsreaktionen (Zhang et al. 2007) stellt ein Vitamin D-Mangel einen weiteren starken Prädiktor eines beschleunigten Fortschreitens der Nierenerkrankung dar (Pilz et al. 2011). Bei den hier untersuchten CKD 3-Patienten wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer reduzierten eGFR und sinkenden  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D-Plasmakonzentrationen nachgewiesen. Insofern dürfte ein progredienter Verlust der renalen  $1\alpha$ -Hydroxylase-Aktivität ursächlich sein. Ein Zusammenhang zwischen der  $25(\text{OH})$ -Vitamin D-Plasmakonzentration und der eGFR konnte nicht nachgewiesen werden. Einundvierzig Prozent der hier untersuchten CKD 3-Patienten wiesen einen suffizienten  $25(\text{OH})$ -Vitamin D-Status auf. Die Rate an Vitamin D-Therapien dürfte dafür mitverantwortlich sein. Einundzwanzig Prozent der Patienten wurden mittels Vitamin-D-Präparaten, vornehmlich inaktivem Vitamin D, therapiert. In früheren Studien konnten niedrige  $25(\text{OH})$ -Vitamin D- und  $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D-Konzentrationen mit dem Fortschreiten der Niereninsuffizienz assoziiert werden (Kalkwarf et al. 2012).

Niedrige  $25(\text{OH})$ -Vitamin D-Konzentrationen bei CKD-Patienten im Stadium 3 bis 5 sind mit erhöhtem Risiko für Gesamtmortalität und CV-Mortalität assoziiert (Pilz et al. 2011). Bei einer Untersuchung des  $25(\text{OH})$ -Vitamin D-Status bei diabetischen Dialysepatienten war eine erniedrigte  $25(\text{OH})$ -Vitamin D-Konzentration mit einem erhöhten Risiko für plötzlichen Herztod assoziiert. Schweres Vitamin D-Defizit führte zu einem 2.8fach höherem Risiko für Schlaganfall, einem zweifach erhöhten Risiko für Tod durch Infektion und einem signifikant erhöhten Risiko für CV-Mortalität (Drechsler et al. 2010 und 2011). Auch *Nakano et al.* (2012) stellten fest, dass höhere  $25(\text{OH})$ -Vitamin D-Level mit einem geringeren Risiko für renale Endpunkte assoziiert sind. Der Vitamin D-Status bei CKD-Patienten kann somit für eine CV-Risikoabschätzung herangezogen werden.

Vitamin D hat zahlreiche Effekte auf Zellen des Immunsystems. Am Beispiel der Expression des Vitamin D-Rezeptors (VDR) und der  $1\alpha$ -Hydroxylase in Immunzellen konnten bereits verschiedene Vitamin D-abhängige Funktionen charakterisiert werden (Overbergh et al. 2000, Veldman et al. 2000). Dabei wird die extrarenale

1- $\alpha$ -Hydroxylase durch diverse Immunstimuli wie Interferon (IFN)- $\gamma$  oder Interleukine gesteuert und ist abhängig von der Verfügbarkeit von Vitamin D (Stoffels et al. 2006). Nach Aktivierung des VDR durch Vitamin D werden in Zellen des angeborenen Immunsystems antimikrobielle Peptide (z.B. Cathelicidin, Defensine) induziert (Liu et al. 2006). Bereits in früheren Untersuchungen von *Liu et al.* (2006) konnte beobachtet werden, dass die Aktivierung von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems durch pathogene Strukturen des Tuberkulose-Erregers eine Induktion des 1- $\alpha$ -Hydroxylase- und des VDR-Gens zur Folge hat und damit zur gezielten Immunreaktion führte, was die Beziehung zwischen dem Vitamin-D-Metabolismus und einer verbesserten Infektabwehr verdeutlicht. Verminderte Vitamin D-Level führten zu einer erhöhten Anfälligkeit für Tuberkulose und zu einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf. In weiteren epidemiologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass niedrige Vitamin D-Level mit der Inzidenz von weiteren verschiedenen Infektionskrankheiten assoziiert sind (Grant et al. 2008).

Weiterhin besitzt Vitamin D immunstimulierende Effekte auf das Monozyten-Makrophagen-System, indem es die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Makrophagen fördert (Kreuz et al. 1990 und 1993) und die pro-inflammatorische Zytokinexpression vermindert (Korf et al. 2012). Jenseits der direkten Modulation der Immunantwort nimmt Vitamin D somit auch Einfluss auf die Proliferation und Reifung von Zellen. Über die Modulation der Zelldifferenzierung ergibt sich eine direkte Verbindung zwischen der Wirkung auf das angeborene und adaptive Immunsystem. Immunsuppressive Effekte von aktivem Vitamin D werden durch eine Inhibierung der Differenzierung und Reifung von DC unter Erhalt von unreifen DC, eine Erhöhung der Sekretion von IL-10, und eine Verminderung der Expression kostimulatorischer Moleküle deutlich (Piemonti et al. 2000, Penna und Adorini 2000). Durch den VDR werden adaptive Immunzellen direkt sowie indirekt über VDR-abhängige Effekte auf DC kontrolliert. Naive T-Zellen differenzieren so in Gegenwart von Calcitriol nicht zu inflammatorischen T-Effektorzellen, sondern zu regulatorischen T-Zellen (Urry et al. 2012), was eine übermäßige Gewebeschädigung verhindert. Bei in vitro-Untersuchungen von *Bartels et al.* (2010) wurden DC durch Lipopolysaccharide in Gegenwart von Calcidiol inkubiert. Es konnte dabei eine reduzierte Expression von DC-Reifungsmarkern, eine erniedrigte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen durch die DC, eine reduzierte DC-Antigen-Präsentation sowie eine

reduzierte DC-Chemotaxis detektiert werden. Inflammatorische Prozesse, die zu erhöhtem CV-Risiko führen können, werden anscheinend begrenzt und inhibiert. Insofern stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang der Plasmakonzentrationen von 25(OH)-Vitamin D und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D zu den gemessenen DCP-Zahlen gibt.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Zahl an mDCP, pDCP und tDCP und den 25(OH)- bzw. 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Spiegeln bei den untersuchten Patienten mit CKD im Stadium 3 festgestellt werden. Während in den zitierten vorliegenden Arbeiten jedoch vorwiegend die Wirkung von Vitamin D auf gewebständige DC untersucht wurde, befasst sich die aktuelle Arbeit mit einer möglichen Wirkung von Vitamin D auf zirkulierende DCP. Diese stellen Vorstufen von gewebständigen DC dar, was das vorliegende Ergebnis erklären kann.

Auch nach Einteilung der CKD 3-Patienten hinsichtlich ihres 25(OH)Vitamin D-Status wiesen die CKD 3-Patienten mit Vitamin D-Defizienz lediglich tendenziell niedrigere absolute mDCP-Zahlen im Vergleich zu CKD 3-Patienten mit insuffizientem bzw. suffizientem Vitamin D-Status auf. PDCP- und tDCP-Zahlen waren zudem bei CKD 3-Patienten mit Vitamin D-Defizienz tendenziell höher im Vergleich zu CKD 3-Patienten mit suffizientem Vitamin D-Status. Bei den untersuchten CKD 3-Patienten konnte weiterhin kein signifikanter Zusammenhang in Patientengruppen mit niedrigen versus hohen DCP-Zahlen und dem 25(OH)-Vitamin D- bzw. 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Status festgestellt werden. Die detektierte 25(OH)-Vitamin D- und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Konzentration scheint daher nicht die Ursache der reduzierten DCP-Zahlen bei den untersuchten CKD 3-Patienten zu sein. 25(OH)-Vitamin D und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D haben den Ergebnissen dieser Untersuchung zufolge vermeintlich keinen Einfluss auf die zirkulierende DCP-Zahl bei CKD 3-Patienten.

Gesteigerte Entzündungsreaktionen in Form einer erhöhten CRP-Konzentration bei erniedrigten 25(OH)-Vitamin D- und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Spiegeln konnten in der vorliegenden Arbeit detektiert werden. Höhere CRP-Konzentrationen korrelieren erwiesenermaßen mit dem Fortschreiten des Nierenfunktionsverlusts im Sinne einer fallenden eGFR (Kalkwarf et al. 2012). Nach erneuter Einteilung der CKD 3-Patienten hinsichtlich ihres 25(OH)-Vitamin D-Status wiesen CKD 3-Patienten mit 25(OH)-Vitamin D-Defizienz signifikant höhere CRP-Werte im Blut als CKD 3-Patienten mit insuffizientem bzw. suffizientem 25(OH)-Vitamin D-Status auf. Bei den CKD 3-



Patienten mit suffizientem 25(OH)-Vitamin D-Level konnten die niedrigsten CRP-Werte detektiert werden. Niedrige 25(OH)-Vitamin D-Spiegel sind also mit höheren Konzentrationen von inflammatorischen Markern wie CRP und IL-6 (Kalkwarf et al. 2012), jedoch offenbar nicht mit erniedrigten DCP assoziiert. Die Erhöhung der Konzentrationen dieser Entzündungsmarker geht zudem signifikant mit dem Verlust der Nierenfunktion einher (Kalkwarf et al. 2012), was ebenfalls bei den untersuchten CKD 3-Patienten beobachtet werden konnte. Die DCP-Zahl war umso geringer, je niedriger die GFR war.

Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Entzündungsmarker CRP, IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 zwischen den CKD 3-Patienten mit versus ohne Vitamin D-Supplementation nachgewiesen werden, was eine Divergenz zu anderen Untersuchungsergebnissen darstellt. Bei in vitro Untersuchungen konnte beispielsweise beobachtet werden, dass DC, die unter dem Einfluss von 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D kultiviert wurden, einer inhibierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine unterlagen, während die IL-10-Produktion erhöht war (Pedersen et al. 2004). Weiterhin zeigten DC eine reduzierte Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung (Pedersen et al. 2004). Eine orale Vitamin D-Supplementation könnte demnach weiterhin protektiv gegenüber der Entwicklung von Atherosklerose wirken. Bei einer Untersuchung bezüglich der Supplementation von oralem 25(OH)-Vitamin D bei ESRD-Patienten konnte zunächst eine kurzfristige Erniedrigung der IL-6-, IL-8- und TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden (Kalkwarf et al. 2012). In Folge einer dauerhaften 25(OH)-Vitamin D-Supplementation und der Einführung einer 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Gabe blieben die TNF- $\alpha$ - und IL-8-Level weiterhin erniedrigt, die IL-6-Konzentration stieg jedoch wieder auf den erhöhten Ausgangswert an. Von den hier untersuchten CKD 3-Patienten erhielten nur rund 21 % eine Vitamin D-Medikation. Die Patienten mit Vitamin D-Supplementation hatten eine signifikant höhere 25(OH)-Vitamin D-, jedoch keine höhere 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu CKD 3-Patienten ohne Vitamin D-Supplementation. Zudem konnte beobachtet werden, dass CKD 3-Patienten ohne Vitamin D-Medikation eine signifikant höhere eGFR aufwiesen, was durch eine noch ausreichende Vitamin D-Versorgung bei noch nicht so weit fortgeschrittener Nierenfunktionsstörung bedingt sein dürfte, die noch keiner Vitamin D-Supplementation bedarf. In der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die mDCP-,

pDCP- sowie tDCP-Zahlen bei den untersuchten CKD 3-Patienten mit versus ohne Vitamin D-Supplementation überraschenderweise nicht. Ein Einfluss von Vitamin D sowohl inaktiv als auch aktiv auf die DCP-Zahl im peripheren Blut konnte somit nicht nachgewiesen werden, was eine mögliche pathophysiologische Rolle von Vitamin D für die nachgewiesene DCP-Erniedrigung bei CKD auszuschließen scheint.

Eine 25(OH)-Vitamin D-Konzentration unter 15 ng/ ml ist zudem mit erhöhtem Risiko für ESRD assoziiert (Melamed et al. 2009). Eine ausreichende Vitamin D-Versorgung könnte daher protektiv gegenüber der Progression der Niereninsuffizienz sein und erhöht somit die Überlebensraten bei CKD und ESRD-Patienten (Kovesdy et al. 2008, Wolf et al. 2008). Verschiedene Studien berichten ferner über antiproteinurische Effekte von Vitamin D-Metaboliten (Doorenbos et al. 2009). Vitamin D-Supplementation bei CKD verbessert demnach nicht nur die Surrogatparameter für erhöhtes CV-Risiko, sondern auch die für CKD-MBD (Kandula et al. 2011) und reduziert die Entstehung von Atherosklerose (Autier und Gandini 2007). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass eine orale Gabe von aktivem Vitamin D zu einer Abnahme atherosklerotischer Läsionen, verminderter Makrophagenakkumulation und T-Zell-Infiltration im Bereich des Aortensinus führt (Takeda et al. 2010), was eine antiatherosklerotische Wirkung von Vitamin D bestätigt. Zugleich wurden eine signifikante Erhöhung regulatorischer T-Zellen, eine Abnahme reifer DC in atherosklerotischen Läsionen, eine erhöhte IL-10-Produktion und eine unterdrückte DC-Reifung nachgewiesen (Takeda et al. 2010).

In zukünftigen Arbeiten sollten daher der Einfluss von Vitamin D auf Patienten in frühen Stadien der CKD, die Beziehung zwischen CKD und den beschriebenen Vitamin D-abhängigen Effekten im Immunsystem sowie die Wirkung von Vitamin D auf zirkulierende DCP und gewebsständige DC genauer untersucht werden.

## 7. Schlussfolgerung

Es kann geschlussfolgert werden,

- dass eine signifikante Erniedrigung der DCP-Zahl im peripheren Blut bereits in frühen Stadien der CKD, hier im Stadium 3, auftritt. Die Analyse der DCP könnte für die Abschätzung des CV Risikos von CKD-Patienten nützlich sein, was prospektiv untersucht werden sollte. Inwieweit die erniedrigten Zellzahlen bei den CKD 3-Patienten vom Ausmaß bislang stummer atherosklerotischer Veränderungen abhängen und damit das CV Risiko determinieren oder nur Ausdruck urämiebedingter inflammatorischer Veränderungen sind, bleibt eine offene Frage.
- dass sich die DCP-Zahlen bei CKD 3-Patienten mit versus ohne Diabetes mellitus nicht signifikant unterscheiden. Ein möglicher Einfluss weiterer Komorbiditäten auf zirkulierende DCP sollte zukünftig bei Patienten mit CKD untersucht werden.
- dass die DCP-Zahl mit der Nierenfunktion assoziiert ist. Eine Ursache für die Reduktion der DCP im peripheren Blut könnte eine funktionelle Beeinträchtigung der DCP-Bildung und -Funktion als Folge der beeinträchtigten Nierenfunktion sein. Eine vermehrte Rekrutierung von DC ins Gewebe einschließlich der Gefäßwand im Rahmen der chronischen Inflammation bei CKD ist wahrscheinlich. Zukünftig sollten die Ursachen der DCP-Erniedrigung bei CKD weiter eruiert werden.
- dass erhöhte CRP-Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf die DCP-Zahl bei CKD 3 ausüben. Die erhöhten CRP-Konzentrationen könnten zu einer DC-Aktivierung im Gewebe führen, was die Reduktion der DCP-Zahl im peripheren Blut der untersuchten CKD 3-Patienten erklären würde. Die DCP-Zahl stellt daher einen Indikator für inflammatorische Prozesse dar.

- dass CRP bereits bei CKD im Stadium 3 mit der eGFR negativ korreliert.
- dass erhöhte Konzentrationen von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 bereits im Stadium 3 der CKD nachgewiesen werden können, diese jedoch nicht mit der DCP-Zahl assoziiert sind. Da die Zytokinkonzentrationen umso höher waren, umso niedriger die eGFR war, könnte ein Zusammenhang erst in späteren CKD-Stadien ersichtlich werden.
- dass ein 25(OH)-Vitamin D-Mangel mit gesteigerter Entzündungsreaktion bei CKD 3-Patienten einhergeht.
- dass ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen eGFR und 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D bestand, was die Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt.
- dass bei CKD 3-Patienten eine Vitamin D-Medikation mit inaktivem Vitamin D zum Anstieg der 25(OH)-Vitamin D-, jedoch nicht der 1,25(OH)-Vitamin D-Plasmakonzentrationen führt. Die in früheren Untersuchungen beobachteten positiven Einflüsse einer Vitamin D-Supplementation wie die Erniedrigung der Plasma-Zytokin- und CRP-Konzentrationen konnten bei den hier untersuchten CKD 3-Patienten nicht nachgewiesen werden.
- dass keine Beziehung zwischen der DCP-Zahl im peripheren Blut und den inaktiven als auch aktiven Vitamin D-Konzentrationen bestand, was somit eine pathophysiologische Rolle von Vitamin D für die nachgewiesene DCP-Erniedrigung im peripheren Blut relativ ausschließt.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

Agrawal S, Gollapudi P, Elahimehr R, Pahl MV, Vaziri ND. 2010. Effects of end-stage renal disease and haemodialysis on dendritic cell subsets and basal and LPS-stimulated cytokine production. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 25(3):737-746.

Artaza JN, Mehrotra R, Norris KC. 2009. Vitamin D and the cardiovascular system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4(9):1515-1522.

Autier P, Gandini S. 2007. Vitamin D supplementation and total mortality: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of Internal Medicine*, 167(16):1730-1737.

Barreto DV, Barreto FC, Liabeuf S, Temmar M, Lemke HD, Tribouilloy C, Choukroun G, Vanholder R, Massy ZA; European Uremic Toxin Work Group (EUTox). 2010. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. *Kidney International*, 77(6):550-556.

Bartels LE, Hvas CL, Agnholt J, Dahlerup JF, Agger R. 2010. Human dendritic cell antigen presentation and chemotaxis are inhibited by intrinsic 25-hydroxy vitamin D activation. *International Immunopharmacology*, 10(8):922-928.

Blankenberg S, Zeller T, Saarela O, Havulinna AS, Kee F, Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Yarnell J, Schnabel RB, Wild PS, Münzel TF, Lackner KJ, Tiret L, Evans A, Salomaa V; MORGAM Project. 2010. Contribution of 30 biomarkers to 10-year cardiovascular risk estimation in 2 population cohorts: the MONICA, risk, genetics, archiving, and monograph (MORGAM) biomarker project. *Circulation*, 121(22):2388-2397.

Bobryshev YV. 2000. Dendritic cells and their involvement in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, 11(5):511-517.

Bobryshev YV. 2005. Monocyte recruitment and foam cell formation in atherosclerosis. *Micron*, 37(3):208-222.

Bobryshev YV. 2010. Vitamin D3 suppresses immune reactions in atherosclerosis, affecting regulatory T cells and dendritic cell function. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30:2317-2319.

Bobryshev YV, Lord RS. 1995. S-100 positive cells in human arterial intima and in atherosclerotic lesions. *Cardiovascular Research*, 29(5):689-696.

Bolton CH, Downs LG, Victory JG, Dwight JF, Tomson CR, Mackness MI, Pinkney JH. 2001. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16(6):1189-1197.

Branchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18:767-811.

Brånén L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. 2004. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 24(11):2137-2142.

Brunet P, Capo C, Dellacasagrande J, Thirion X, Mege JL, Berland Y. 1998. IL-10 synthesis and secretion by peripheral blood mononuclear cells in haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 13(7):1745-1751.

Busch M, Franke S, Müller A, Wolf M, Gerth J, Ott U, Niwa T, Stein G. 2004. Potential cardiovascular risk factors in chronic kidney disease: AGEs, total homocysteine and metabolites, and the C-reactive protein. *Kidney International*, 66(1):338-347.

Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP, Levey AS. 2000. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney International*,58: 353–362.

Chistiakov DA, Sobenin IA<sup>2</sup>, Orekhov AN<sup>3</sup>, Bobryshev YV<sup>4</sup>. 2014. Dendritic cells in atherosclerotic inflammation: the complexity of functions and the peculiarities of pathophysiological effects.*Frontiers in Physiology*, 5:Article196.

Chowdhury F, Johnson P, Williams AP. 2010. Enumeration and phenotypic assessment of human plasmacytoid and myeloid dendritic cells in whole blood. *Cytometry A*, 77(4):328-337.

Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 5(12):1219-1226.

De Boer IH, Ioannou GN, Kestenbaum B, Brunzell JD, Weiss NS. 2007. 25-Hydroxyvitamin D levels and albuminuria in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *American Journal of Kidney Disease*, 50(1):69-77.

De Luca HF. 2004. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6 Suppl.):1689S-1696S.

Descamps-Latscha B, Herbelin A, Nguyen AT, Roux-Lombard P, Zingraff J, Moynot A, Verger C, Dahmane D, de Groote D, Jungers P. 1995. Balance between IL-1 beta, TNF-alpha, and their specific inhibitors in chronic renal failure and maintenance dialysis. Relationships with activation markers of T cells, B cells, and monocytes. *Journal of Immunology*, 154(2):882-892.

De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major

histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine*, 174(4):915-924.

Di Angelantonio E, Chowdhury R, Sarwar N, Aspelund T, Danesh J, Gudnason V. 2010. Chronic kidney disease and risk of major cardiovascular disease and non-vascular mortality: prospective population based cohort study. *British Medical Journal*, 341:c4986.

Doorenbos CR, van den Born J, Navis G, de Borst MH. 2009. Possible renoprotection by vitamin D in chronic renal disease: beyond mineral metabolism. *Nature Reviews Nephrology*, 5(12):691-700.

Drechsler C, Pilz S, Obermayer-Pietsch B, Verduijn M, Tomaschitz A, Krane V, Espe K, Dekker F, Brandenburg V, März W, Ritz E, Wanner C. 2010. Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. *European Heart Journal*. 31:2253-2261.

Drechsler C1, Verduijn M, Pilz S, Dekker FW, Krediet RT, Ritz E, Wanner C, Boeschoten EW, Brandenburg V; NECOSAD Study Group. 2011. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(3):1024-1032.

Echida Y, Mochizuki T, Uchida K, Tsuchiya K, Nitta K. 2012. Risk factors for vitamin D deficiency in patients with chronic kidney disease. *Internal Medicine*, 51(8):845-850.

Eckardt KU, Barthlein B, Baid-Agrawal S, Beck A, Busch M, Eitner F, Ekici AB, Floege J, Gefeller O, Haller H, Hilge R, Hilgers KF, Kielstein JT, Krane V, Köttgen A, Kronenberg F, Oefner P, Prokosch HU, Reis A, Schmid M, Schaeffner E, Schultheiss UT, Seuchter SA, Sitter T, Sommerer C, Walz G, Wanner C, Wolf G, Zeier M, Titze S. 2012. The German Chronic Kidney Disease (GCKD) study: design and methods. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(4):1454-1460.



Feneis JF, Arora RR. 2010. Role of vitamin D in blood pressure homeostasis. *American Journal of Therapeutics*, 17(6):e221-229.

Finkelman FD, Lees A, Birnbaum R, Gause WC, Morris SC. 1996. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *Journal of Immunology*, 157:1406-1414.

Fox ER, Benjamin EJ, Sarpong DF, Nagarajao H, Taylor JK, Steffes MW, Salahudeen AK, Flessner MF, Akyzbekova EL, Fox CS, Garrison RJ, Taylor HA Jr. 2010. The relation of C-reactive protein to chronic kidney disease in African Americans: the Jackson Heart Study. *BMC Nephrology*. Jan 15;11:1. doi: 10.1186/1471-2369-11-1.

Frenzel H, Pries R, Brocks CP, Jabs WJ, Wittkopf N, Wollenberg B. 2007. Decreased migration of myeloid dendritic cells through increased levels of C-reactive protein. *Anticancer Research*, 27(6B):4111-4115.

Fried L, Solomon C, Shlipak M, Seliger S, Stehman-Breen C, Bleyer AJ, Chaves P, Furberg C, Kuller L, Newman A. 2004. Inflammatory and prothrombotic markers and the progression of renal disease in elderly individuals. *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(12):3184-3191.

Fried LF, Katz R, Cushman M, Sarnak M, Shlipak MG, Kuller L, Newman AB. 2009. Change in cardiovascular risk factors with progression of kidney disease. *American Journal of Nephrology*, 29(4):334-341.

Galkina E, Kadl A, Sanders J, Varughese D, Sarembock IJ, Ley K. 2006. Lymphocyte recruitment into the aortic wall before and during development of atherosclerosis is partially L-selectin dependent. *Journal of Experimental Medicine*, 203(5):1273-1282.

Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K, Wen CP. 2013. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*, 382(9889):339-352.

Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. 2004. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New England Journal of Medicine*, 351(13):1296-1305.

Grant WB, Garland CF. 2008. The role of vitamin D3 in preventing infections. *Age Ageing*, 37(1):121-122.

Hage FG, Venkataraman R, Zoghbi GJ, Perry GJ, DeMattos AM, Iskandrian AE. 2009. The scope of coronary heart disease in patients with chronic kidney disease. *Journal of the American College of Cardiology Foundation*, 53:2129-2140.

Hansson G. 2005. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, 352:1685-1695.

Heaney RP. 2008. Vitamin D in health and disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(5):1535-1541.

Herzog CA, Asinger RW, Berger AK, Charytan DM, Díez J, Hart RG, Eckardt KU, Kasiske BL, McCullough PA, Passman RS, DeLoach SS, Pun PH, Ritz E. 2011. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney International*, 80(6):572-586.

Hesselink DA, Betjes MG, Verkade MA, Athanassopoulos P, Baan CC, Weimar W. 2005. The effects of chronic kidney disease and renal replacement therapy on circulating dendritic cells. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(9):1868-1873.

Himmelfarb J. 2009. Uremic toxicity, oxidative stress, and hemodialysis as renal replacement therapy. *Seminars in Dialysis*, 22(6):636-643.

Holick MF. 2007. Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, 357(3):266-281.

Institute of Medicine. 2010. Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington: National Academy of Sciences; 2010.

Jones G. 2007. Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 $\alpha$ -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Seminars in Dialysis*, 20(4):316-324.

Kalkwarf HJ, Denburg MR, Strife CF, Zemel BS, Foerster DL, Wetzsteon RJ, Leonard MB. 2012. Vitamin D deficiency is common in children and adolescents with chronic kidney disease. *Kidney International*, 81:690-697.

Kandula P, Dobre M, Schold JD, Schreiber MJ Jr, Mehrotra R, Navaneethan SD. 2011. Vitamin D supplementation in chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies and randomized controlled trials. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 6(1):50-62.

Kato A, Takita T, Furuhashi M, Maruyama Y, Kumagai H, Hishida A. 2008. Blood monocyte count is a predictor of total and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Nephron Clinical Practice*, 110(4):c235-243.

Kawahara I, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Hayashi T, Koji T. 2007. The expression of vascular dendritic cells in human atherosclerotic carotid plaques. *Human Pathology*, 38(9):1378-1385.

K/DOQI Workgroup. 2005. K/DOQI clinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patients. 45(4 Suppl. 3):S1-153.

Kofler S, Sisic Z, Shvets N, Lohse P, Weis M. 2011. Expression of circulatory dendritic cells and regulatory T-cells in patients with different subsets of coronary artery disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57(5):542-549.

Korf H, Wenes M, Stijlemans B, Takiishi T, Robert S, Miani M, Eizirik DL, Gysemans C, Mathieu C. 2012. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 curtails the inflammatory and T cell stimulatory capacity of macrophages through an IL-10-dependent mechanism. *Immunobiology*,217(12):1292-1300.

Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K. 2008. Association of activated vitamin D treatment and mortality in chronic kidney disease. *Archives of Internal Medicine*, 168(4):397-403.

Kretzschmar D, Betge S, Windisch A, Pistulli R, Rohm I, Fritzenwanger M, Jung C, Schubert K, Theis B, Petersen I, Drobnik S, Mall G, Figulla HR, Yilmaz A. 2012. Recruitment of circulating dendritic cell precursors into the infarcted myocardium and pro-inflammatory response in acute myocardial infarction. *Clinical Science London*, 123(6):387-398.

Kreutz M, Andreesen R. 1990. Induction of human monocyte to macrophage maturation in vitro by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood*, 76(12):2457-2461.

Kreutz M, Andreesen R, Krause SW, Szabo A, RitzE, Reichel H. 1993.1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages. *Blood*, 82(4):1300-1307.

Kuga S, Otsuka T, Nihiro H, Nunoi H, Nemoto Y, Nakano T, Ogo T, Umei T, Niho Y. 1996. Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase.*Experimental Hematology*, 24(2):151-157.

Levey AS, Coresh J. 2012. Chronic kidney disease. *Lancet*, 379(9811):165-180.

Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL. 2007. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients

with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney International*, 71(1):31-38.

Li YC. 2010. Renoprotective effects of vitamin D analogs. *Kidney International*, 78(2):134-139.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9):1135-1143.

Lim WH, Kireta S, Leedham E, Russ GR, Coates PT. 2007. Uremia impairs monocyte-derived dendritic cell function in hemodialysis patients. *Kidney International*, 72(9):1138-1148.

Lim WH, Kireta S, Thomson AW, Russ GR, Coates PT. 2006. Renal transplantation reverses functional deficiencies in circulating dendritic cell subsets in chronic renal failure patients. *Transplantation*, 81(2):160-168.

Lin SL, Chen YM, Chien CT, Chiang WC, Tsai CC, Tsai TJ. 2002. Pentoxifylline attenuated the renal disease progression in rats with remnant kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(12):2916-2929.

Liu YJ. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*, 106:259-262.

Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, Ochoa MT, Schaubert J, Wu K, Meinken C, Kamen DL, Wagner M, Bals R, Steinmeyer A, Zügel U, Gallo RL, Eisenberg D, Hewison M, Hollis BW, Adams JS, Bloom BR, Modlin RL. 2006. Toll-like receptor triggering of vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science*, 311:1770-1773

Llodrá J, Angeli V, Liu J, Trogan E, Fisher EA, Randolph GJ. 2004. Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not

progressive, plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(32):11779-11784.

McTernan PG, McTernan CL, Chetty R, Jenner K, Fisher FM, Lauer MN, Crocker J, Barnett AH, Kumar S. 2002. Increased resistin gene and protein expression in human abdominal adipose tissue. *Journal of Endocrinological Metabolism*, 87(5):2407.

Mantovani A, Garlanda C, Locati M. 2009. Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(10):1419-1423.

Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*, 106:255-258.

Meisel C, Vogt K, Platzer C, Randow F, Liebenthal C, Volk HD. 1996. Differential regulation of monocytic tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 expression. *European Journal of Immunology*, 26(7):1580-1586.

Mehrotra R, Kermah D, Budoff M, Salusky IB, Mao SS, Gao YL, Takasu J, Adler S, Norris K. 2008. Hypovitaminosis D in chronic kidney disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(4):1144-1151.

Menon V, Greene T, Wang X, A Pereira A, Marcovina SM, Beck GJ, Kusek JW, Collins AJ, Levey AS, Sarnak MJ. 2005. C-reactive protein and albumin as predictors of all-cause and cardiovascular mortality in chronic kidney disease. *Kidney International*, 68:766–772.

Melamed ML, Astor B, Michos ED, Hostetter TH, Powe NR, Muntner P. 2009. 25-hydroxyvitamin D levels, race, and the progression of kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(12):2631-2639.

Morita Y, Yamamura M, Kashihara N, Makino H. 1997. Increased production of interleukin-10 and inflammatory cytokines in blood monocytes of hemodialysis

patients. Research communications in molecular pathology and pharmacology, 98(1):19-33.

Nakanishi I, Moutabarrik A, Okada N, Kitamura E, Hayashi A, Syouji T, Namiki M, Ishibashi M, Zaid D, Tsubakihara Y. 1994. Interleukin-8 in chronic renal failure and dialysis patients. Nephrology Dialysis Transplantation, 9(10):1435-1442.

Nakano C, Hamano T, Fujii N, Matsui I, Tomida K, Mikami S, Inoue K, Obi Y, Okada N, Tsubakihara Y, Isaka Y, Rakugi H. 2012. Combined use of vitamin D status and FGF23 for risk stratification of renal outcome. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 7(5):810-819.

National Kidney Foundation. 2002. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. American Journal of Kidney Disease, 39(2 Suppl. 1):S1-266.

National Kidney Foundation. 2013.KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney International Supplements, 3 (1):S1-163.

Niessner A, Weyand CM. 2010. Dendritic cells in atherosclerotic disease. Clinical Immunology, 134:25–32.

Noessner E, Lindenmeyer M, Nelson PJ, Segerer S. 2011. Dendritic cells in human renal inflammation--Part II. Nephron Experimental Nephrology, 119(4):e91-98-

Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J. 2004. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. Kidney International, 65(3):1009-1016.

Olszyna DP, Pajkrt D, Lauw FN, van Deventer SJH, van der Poll T. 2000. Interleukin 10 inhibits the release of CC chemokines during human endotoxemia. The Journal of Infectious Diseases, 181:613–620.

Overbergh L, Decallonne B, Valckx D, Verstuyf A, Depovere J, Laureys J, Rutgeerts O, Saint-Arnaud R, Bouillon R, Mathieu C. 2000. Identification and immune regulation of 25-hydroxyvitamin D-1-alpha-hydroxylase in murine macrophages. *Clinical Experimental Immunology*, 120(1):139-146.

Paul K, Kretzschmar D, Yilmaz A, Bärthlein B, Titze S, Wolf G, Busch M; GCKD-Study Investigators. 2013. Circulating dendritic cell precursors in chronic kidney disease: a cross-sectional study. *BMC Nephrology*, 14:274, doi: 10.1186/1471-2369-14-274.

Pecoits-Filho R, Bárány P, Lindholm B, Heimbürger O, Stenvinkel P. 2002. Interleukin-6 is an independent predictor of mortality in patients starting dialysis treatment. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 17(9):1684-1688.

Pedersen AE, Gad M, Walter MR, Claesson MH. 2004. Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D(3). *Immunological Letter*, 91(1):63-69.

Penna G, Adorini L. 2000. 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *Journal of Immunology*, 164(5):2405-2411.

Piemonti L, Monti P, Sironi M, Fraticelli P, Leone BE, Dal Cin E, Allavena P, Di Carlo V. 2000. Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology*, 164(9):4443–4451.

Pilz S, Tomaschitz A, Friedl C, Amrein K, Drechsler C, Ritz E, Boehm BO, Grammer TB, März W. 2011. Vitamin D status and mortality in chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26:3603-3609.

Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. 2003. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*, 107(3):391-397.



Ross R. 1999. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*, 340:115–126.

Roubicek T, Bartlova M, Krajickova J, Haluzikova D, Mraz M, Lacinova Z, Kudla M, Teplan V, Haluzik M. 2009. Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. *Nutrition*, 25(7-8):762-768.

Sato K, Fujita S. 2007. Dendritic cells nature and classification. *Allergology International*, 56 (3):183-191.

Schober-Halstenberg. 2007. QUASI Niere, Nierenersatztherapie in Deutschland 2006/2007).Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland.

Shi H, Ge J, Fang W, Yao K, Sun A, Huang R, Jia Q, Wang K, Zou Y, Cao X. 2007. Peripheral-blood dendritic cells in men with coronary heart disease. *American Journal of Cardiology*, 100(4):593-597-

Shortman K, Naik SH. 2007. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology*, 7(1):19-30.

Song S, Ling-Hu H, Roebuck KA, Rabbi MF, Donnelly RP, Finnegan A. 1997. Interleukin-10 Inhibits Interferon- $\gamma$ -Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 Gene Transcription in Human Monocytes. *Blood*: 89 (12):4461-4469.

Steinman RM. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology*, 9:271-296.

Spoto B, Leonardis D, Parlongo RM, Pizzini P, Pisano A, Cutrupi S, Testa A, Tripepi G, Zoccali C, Mallamaci F. 2011. Plasma cytokines, glomerular filtration rate and adipose tissue cytokines gene expression in chronic kidney disease (CKD) patients. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, 22(11):981-988.

Steinman RM, Cohn ZA. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5):1142-1162.

Steinman RM. 2007. Dendritic cells: understanding immunogenicity. *European Journal of Immunology*, 37 Suppl. 1:S53-60.

Stenvinkel P, Heimbürger O, Paulter F, Diczfalusy U, Wang T, Berglund L, Jogestrand T. 1999. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. *Kidney International*, 55(5):1899-911.

Stenvinkel P, Heimbürger O, Jogestrand T. 2002. Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid artery atherosclerosis in dialysis patients: Association with *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *American Journal of Kidney Disease*, 39(2):274–282.

Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson RJ, Lindholm B, Pecoits-Filho R, Riella M, Heimbürger O, Cederholm T, Girndt M. 2005. IL-10, IL-6, and TNF- $\alpha$ : central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney International*, 67(4):1216-33.

Stinghen AE, Bucharles S, Riella MC, Pecoits-Filho R. 2010. Immune mechanisms involved in cardiovascular complications of chronic kidney disease. *Blood Purification*, 29(2):114-1120.

Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. 2000. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology & Cell Biology*, 78(2):91-102.

Stoffels K, Overbergh L, Giulietti A, Verlinden L, Bouillon R, Mathieu C. 2006. Immune regulation of 25-hydroxyvitamin-D3-1 $\alpha$ -hydroxylase in human monocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(1):37-47.

Stuveling EM, Hillege HL, Bakker SJ, Gans RO, De Jong PE, De Zeeuw D. 2003. C-reactive protein is associated with renal function abnormalities in a non-diabetic population. *Kidney International*, 63(2):654-661.

Sun H, Koike T, Ichikawa T, Hatakeyama K, Shiomi M, Zhang B, Kitajima S, Morimoto M, Watanabe T, Asada Y, Chen YE, Fan J. 2005. C-reactive protein in atherosclerotic lesions: its origin and pathophysiological significance. *American Journal of Pathology*, 167:1139 –1148.

Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Hirata K. 2012. Dendritic cells in atherogenesis: possible novel targets for prevention of atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 19(11):953-961.

Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, Ishida T, Hirata K. 2010. Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12):24958-25003.

Tesar V. 2003. Cardiovascular complications in patients with chronic renal insufficiency and chronic kidney failure. *Vnitřní Lékarství*, 49(5): 383-387.

Urry Z, Chambers ES, Xystrakis E, Dimeloe S, Richards DF, Gabryšová L, Christensen J, Gupta A, Saglani S, Bush A, O'Garra A, Brown Z, Hawrylowicz CM. 2012. The role of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and cytokines in the promotion of distinct Foxp3<sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells. *European Journal of Immunology*, 42(10):2697-2708.

Valdivielso JM. 2009. The physiology of vitamin D receptor activation. *Contributions to Nephrology*, 163:206-212.

Van Brussel I, Van Vré EA, De Meyer GR, Vrints CJ, Bosmans JM, Bult H. 2010. Expression of dendritic cell markers CD11c/BDCA-1 and CD123/BDCA-2 in coronary

artery disease upon activation in whole blood. *Journal of Immunology Methods*, 362(1-2):168-175.

Van Vré EA, Bult H, Hoymans VY, Van Tendeloo VF, Vrints CJ, Bosmans JM. 2008. Human C-reactive protein activates monocyte-derived dendritic cells and induces dendritic cell-mediated T-cell activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(3):511-518.

Van Vré EA, Van Brussel I, de Beeck KO, Hoymans VY, Vrints CJ, Bult H, Bosmans JM. 2010. Changes in blood dendritic cell counts in relation to type of coronary artery disease and brachial endothelial cell function. *Coronary Artery Disease*, 21(2):87-96.

Van Vré EA, Hoymans VY, Bult H, Lenjou M, Van Bockstaele DR, Vrints CJ, Bosmans JM. 2006. Decreased number of circulating plasmacytoid dendritic cells in patients with atherosclerotic coronary artery disease. *Coronary Artery Disease*, 17(3):243-248.

Veldman CM, Cantorna MT, DeLuca HF. 2000. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 374(2):334-338.

Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I. 2002. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 106(12):1439-1441.

Vermaelen KY, Carro-Muino I, Lambrecht BN, Pauwels RA. 2001. Specific Migratory Dendritic Cells Rapidly Transport Antigen from the Airways to the Thoracic Lymph Nodes. *Journal of Experimental Medicine*, 193(1):51-60.

Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. 2002. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney International Supplements*, 80:99-102.

Wertheimer AM, Bakke A, Rosen HR. 2004. Direct enumeration and functional assessment of circulating dendritic cells in patients with liver disease. *Hepatology*, 40(2):335-345.

West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, Prescott AR, Watts C. 2004. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*, 305:1153-1157.

Wolf M, Betancourt J, Chang Y, Shah A, Teng M, Tamez H, Gutierrez O, Camargo CA Jr, Melamed M, Norris K, Stampfer MJ, Powe NR, Thadhani R. 2008. Impact of activated vitamin D and race on survival among hemodialysis patients. *Journal of the American Society of Nephrology*, 19(7):1379-1388.

Wright J, Hutchison A. 2009. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *Journal of Vascular Health and Risk Management*, 5:713-722.

Yeh ETH. 2004. CRP as a mediator of disease. *Circulation*, 109:II-11-II-14.

Yilmaz A, Lochno M, Traeg F, Cicha I, Reiss C, Stumpf C, Raaz D, Anger T, Amann K, Probst T, Ludwig J, Daniel WG, Garlischs CD. 2004. Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis*, 176(1):101-110.

Yilmaz A, Schaller T, Cicha I, Altendorf R, Stumpf C, Klinghammer L, Ludwig J, Daniel WG, Garlischs CD. 2009. Predictive value of the decrease in circulating dendritic cell precursors in stable coronary artery disease. *Clinical Science*, 116:353-363.

Yilmaz A, Weber J, Cicha I, Stumpf C, Klein M, Raithel D, Daniel WG, Garlischs CD. 2006. Decrease in circulating myeloid dendritic cell precursors in coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(1):70-80.

Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C. 2008. Chemokines in atherosclerosis: an update. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 28(11):1897-1908.

Zhang Z, Yuan W, Sun L, Szeto FL, Wong KE, Li X, Kong J, Li YC. 2007. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 targeting of NF-kappa B suppresses high glucose-induced MCP-1 expression in mesangial cells. *Kidney International*, 72(2):193–201.

Zhu SN, Chen M, Jongstra-Bilen J, Cybulsky MI. 2009. GM-CSF regulates intimal cell proliferation in nascent atherosclerotic lesions. *Journal of Experimental Medicine*, 206(10):2141-2149.

Internetseiten:

Deutsche Adipositas Gesellschaft (DAG)

[www.adipositas-gesellschaft.de](http://www.adipositas-gesellschaft.de)

Stand: 11.12.2014

## 9. Anhang

### I. Amendment für die Ethikkommission bezüglich einer zusätzlichen Einwilligungserklärung für die DC-Substudie

Universitätsklinikum Jena - Klinik für Innere Medizin III - Postfach: 07740 Jena

**Ethikkommission  
der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller Universität  
Bachstraße 18  
07743 Jena**

**Ethik-Kommission  
Geschäftsstelle  
23. Dez. 2010  
2455-03/09**

**Universitätsklinikum  
Jena**

**Klinik für Innere Medizin III  
Nephrologie, Rheumatologie/Osteologie,  
Endokrinologie/Stoffwechselerkrankungen**

**Direktor:**  
Univ.-Prof. Dr. Gunter Wolf, MHBA

**Besucheradresse:**  
Erlanger Allee 101  
07747 Jena

**Bereiche**

Station 410/Akutdialyse	9326413	9326412
Station 430/Nephrologie	9326823	9326822
Station 431/Endokrinologie/Stoffwechsel	9326830	9326832
Station 441/Rheumatologie/Osteologie	9326843	9326842
Nephrologische Ambulanz	9324353	9324352
Nierentransplantationsambulanz	9324351	9324352
Rheumatologische Ambulanz	9324360	9324362
Poliklinik Endokrinologie/Stoffwechsel	934843	933009
Chefsekretariat	9324301	9324302

**Telefon (03641-)/Fax**

Die Klinik für Innere Medizin III ist nach  
DIN EN ISO 9001:2000-12 zertifiziert

Jena, 21.12.2010

#### Amendment - „GCKD-Studie – Chronische Niereninsuffizienz in Deutschland“

Sehr geehrte Damen und Herren,

im Rahmen der GCKD-Studie (Bearbeitungsnummer 2495-03/09) möchte das Universitätsklinikum Jena eine freiwillige Zusatzuntersuchung durchführen. Die Patienten werden dabei um gesondertes Einverständnis (siehe Anlage) gebeten, die Teilnahme wird nur Patienten vom Regionalzentrum Jena (aus methodischen Gründen) angeboten. Sind die Patienten nicht mit der freiwilligen Zusatzuntersuchung einverstanden, entstehen ihnen dadurch keine Nachteile.

Bei Einverständnis werden dem Patienten im Rahmen der Blutabnahme der GCKD-Studie zwei zusätzliche Blutproben (1 EDTA 2.7mL; 1 Serum 9mL) abgenommen. Diese werden gesondert von den Proben für die GCKD-Studie gekühlt gelagert, nach Jena transportiert und analysiert.

Wir hoffen, dass die vorgeschlagenen Ergänzungen Ihre Zustimmung finden, und wären für eine baldige Benachrichtigung dankbar.

Prof. Dr. G. Wolf  
Studienleiter GCKD-Studie  
Regionalzentrum Jena

Bachstraße 18 - 07743 Jena - Telefon 03641 93 00  
Internet: www.uniklinikum-jena.de  
Gerichtsstand Jena  
Steuernummer 161 / 144 / 02978 - USt-IdNr. DE 150545777  
Bankverbindung:  
Sparkasse Jena - BLZ 830 530 30 - Konto 221

Universitätsklinikum Jena - Körperschaft des öffentlichen Rechts  
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Diefel  
Kaufmännischer Vorstand  
und Sprecher des Klinikumsvorstandes: Rudolf Kruse  
Medizinischer Vorstand: Prof. Dr. Klaus Hoffken  
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Berndorf

## II. Bestätigung über die Zulassung der zusätzlichen Einwilligung für die DC-Substudie



Universitätsklinikum  
Jena

Ethik-Kommission

Vorsitzende: Prof. Dr. med. Dagmar Barz  
Geschäftsstelle: Dr. phil. Ulrike Skorsetz

Bachstraße 18  
07743 Jena

Telefon 03641 93 37 70  
Telefax 03641 93 37 71

E-Mail: [ethikkommission@med.uni-jena.de](mailto:ethikkommission@med.uni-jena.de)

3. Januar 2011

Universitätsklinikum Jena - Ethik-Kommission - Postfach 07740 Jena

Prof. Dr. Wolf  
Klinik für Innere Medizin III  
UKJ  
07740 Jena

Bearbeitungsnummer: 2495-03/09

*German Chronic Kidney Disease Study (GCKD)*

Sehr geehrter Herr Professor Wolf,

hiermit bestätigen wir den Eingang und die Kenntnisnahme Ihres Schreibens vom  
21.12.2010.

Gegen die freiwillige Zusatzuntersuchung bestehen keine ethischen oder berufsrechtlichen  
Bedenken.

Mit freundlichen Grüßen


  
Prof. Dr. med. D. Barz  
Vorsitzende der Ethik-Kommission  
(i. A. Dr. U. Skorsetz)

Bachstraße 18 · 07743 Jena · Telefon 03641 93 00  
Internet: [www.uniklinikum-jena.de](http://www.uniklinikum-jena.de)  
Grenzstandort Jena  
Steuernummer 161 / 144 / 02978 · USt-IdNr. DE 150545777  
Bankverbindung:  
Sparkasse Jena · BLZ 830 530 30 · Konto 221

Universitätsklinikum Jena · Körperschaft des öffentlichen Rechts  
als Teilkörperschaft der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
Kaufmännischer Vorstand:  
und Sprecher des Klinikumsvorstandes: Rudolf Kruse  
Verwaltungsratsvorsitzender: Prof. Dr. Thomas Deutel  
Medizinischer Vorstand: Prof. Dr. Klaus Hoffken  
Wissenschaftlicher Vorstand: Prof. Dr. Klaus Benndorf



### III. Einwilligungserklärung für die DC-Substudie

GCKD – Beobachtungsstudie				<b>Klinik für Innere Medizin III</b> <b>Nephrologie, Rheumatologie/Osteologie,</b> <b>Endokrinologie/Stoffwechselerkrankungen</b>	
<u>Patient/Patientin</u>		<b>Direktor:</b> Univ.-Prof. Dr. Gunter Wolf, MHBA		<b>Besucheradresse:</b> Erlanger Allee 101 07747 Jena	
<u>Geburtsdatum</u>		<u>Pseudonym</u>		<b>GCKD Regionalzentrum</b> Herr Dr. Busch	
<u>Zentrum</u> JE -		<b>GCKD Regionalzentrum</b> Frau K. Paul		Telefon (03641-) 9324621 Fax (03641-) 9324352 Telefon (03641-) 9324624	

**Einwilligungserklärung**  
**für eine freiwillige Zusatzuntersuchung**  
**im Rahmen der GCKD-Studie**

**Information**

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

im Rahmen der GCKD-Studie möchte das Universitätsklinikum Jena weitere Untersuchungen durchführen, um neue Erkenntnisse, vor allem für eine verbesserte Prognose Ihres Krankheitsverlaufes, zu gewinnen. Dazu möchten wir Sie bitten, einer Abnahme zweier **zusätzlicher Blutproben** bei der Blutabnahme im Rahmen der GCKD-Studie zuzustimmen. Mit Hilfe dieser zusätzlichen Blutproben sollen Biomarker (u.a. dendritische Zellen) auf deren Aussagefähigkeit über zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse bei chronisch nierenkranken Patienten getestet werden.

Mit der Teilnahme an dieser Substudie verpflichten Sie sich zu **keinem weiteren Aufwand**, es gelten die gleichen Bedingungen und Risiken der GCKD-Studie. Ihre Daten werden ebenso vertraulich behandelt und Ihre Blutproben in pseudonymisierter (verschlüsselter) Form gelagert, analysiert und in anonymer Form ausgewertet.

Über Ihre Teilnahme würden wir uns sehr freuen!

**Einwilligungserklärung**

Ich bin mit der **Entnahme** zweier **zusätzlicher Blutproben** (1 EDTA 2.7mL; 1 Serum 9mL) im Rahmen der Blutabnahme der GCKD-Studie einverstanden und überlasse diese Proben hiermit dem Universitätsklinikum Jena. Mit meiner Unterschrift übertrage ich die Nutzungsrechte der im Rahmen der GCKD-Studie erhobenen klinischen Daten und der Blutproben an die o.g. Institution, solange die Einwilligung nicht widerrufen wird. Ich weiß, dass ich meine **Zustimmung** zur Verwendung meiner Daten und meiner Blutprobe **jederzeit, ohne Angabe von Gründen und ohne, dass mir dadurch Nachteile entstehen, widerrufen kann**. Das Recht auf **Nutzung** meiner Materialien und Daten im Sinne dieser Einwilligung bleibt auch über meinen Tod hinaus bestehen.

.....

Name der Patientin / des Patienten in Druckbuchstaben

..... Datum	..... Unterschrift der <b>Patientin / des Patienten</b>
..... Datum	..... Unterschrift des <b>Arztes</b> , der die Einwilligung eingeholt hat

- 1 -

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	DCP-Anzahl im Zeitverlauf - Mittelwerte von DCP dreier verschiedener Blutproben von drei Patienten.....	34
Tabelle 2	Klinische Daten der Kontrollen und CKD 3-Patienten .....	37
Tabelle 3	Anzahl zirkulierender DCP der CKD 3-Patienten und Kontrollen .....	38
Tabelle 4	Lineare Regression.....	40
Tabelle 5	Anzahl zirkulierender DCP bei CKD 3-Patienten mit und ohne bisherige CVE .....	41
Tabelle 6	Plasma-Zytokin-Konzentrationen der CKD 3- und Kontrollpatienten ....	45
Tabelle 7	Vitamin D-Konzentrationen bei CKD 3- und Kontrollpatienten .....	46
Tabelle 8	Einteilung der CKD 3-Patienten hinsichtlich ihres Vitamin D-Status .....	48

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Funktionszustände einer dendritischen Zelle .....	4
Abbildung 2	Stadien und Prognose für eine chronische Nierenerkrankung nach der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und Albuminausscheidung..	6
Abbildung 3	Die Beziehung zwischen chronischer Niereninsuffizienz und kardiovaskulären Ereignissen.....	8
Abbildung 4	Folgen der Inflammation.....	9
Abbildung 5	Zytokine und Chemokine, die von reifen dendritischen Zellen in atherosklerotischen Gefäßen gebildet werden .....	10
Abbildung 6	Vitamin D-Defizit bei chronischer Niereninsuffizienz .....	14
Abbildung 7	Mögliche Effekte der oralen Vitamin D-Supplementation (aktive Form) auf atherosklerotische Prozesse .....	15
Abbildung 8	Beispiel einer FACS-Analyse .....	24
Abbildung 9	Quantifikation der Zytokine IL-6 (A7), IL-10 (B7) und TNF- $\alpha$ (C4) mit Hilfe einer alphanummerischen Zuordnung.....	26
Abbildung 10	Extraktion der Proben bei der 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D-Messung.....	31

Abbildung 11	Relative und absolute Zellzahlen von zirkulierenden mDCP, pDCP und tDCP bei Kontrollen (n=85) und CKD 3-Patienten (n=287), sowie CKD 3-Patienten ohne bisherige CVE (n=165) vs. mit bisherigen CVE (n=122) .....	42
Abbildung 12	Absolute mDCP-, pDCP-, und tDCP-Zahlen bei CKD 3-Patienten mit (n=112) und ohne (n=175) Diabetes mellitus .....	42
Abbildung 13	Korrelation der absoluten zirkulierenden mDCP-, pDCP- und tDCP-Zellzahlen mit der eGFR (ml/ min) bei koronar gesunden Kontrollen (n=85) und CKD 3-Patienten (n=287).....	43
Abbildung 14	Korrelation der absoluten zirkulierenden mDCP-, pDCP- und tDCP-Zellzahlen, sowie der eGFR mit der gemessenen hsCRP-Konzentration (mg/ l) bei CKD 3-Patienten (n=287) .....	44
Abbildung 15	Plasma-Konzentrationen von IL-6, TNF- $\alpha$ und IL-10 bei CKD 3-Patienten (n=208) und Kontrollen (n=41) .....	45
Abbildung 16	Korrelation der eGFR und der gemessenen hsCRP-Werte mit der 25(OH)-Vitamin D- (n=272) und 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D- (n=186) Konzentration bei CKD 3-Patienten.....	47
Abbildung 17	Vergleich der 25(OH)-Vitamin D-Konzentrationen (A, n=272), 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D-Konzentrationen (B, n=186), der eGFR (C, n=287) und der hsCRP-Werte (D, n=287) bei CKD 3-Patienten mit (n=61) und ohne (n=226) Vitamin D-Medikation.....	49
Abbildung 18	Vergleich der absoluten mDCP (A, n=287), pDCP (B, n=287), tDCP (C, n=287), IL-6- (D, n=208), TNF- $\alpha$ - (D, n=208) sowie IL-10-Konzentrationen (F, n=208) bei CKD 3-Patienten mit (n=61) und ohne (n=226) Vitamin D-Medikation .....	50

## **Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Gunter Wolf für die Möglichkeit, in seiner Abteilung in einer professionellen und kollegialen Atmosphäre zu promovieren, für seine Hilfestellung bei wissenschaftlichen Fragestellungen und der Vorbereitung von Präsentationen, sowie der Möglichkeit, die Ergebnisse dieser Arbeit auf diversen Kongressen vorzustellen.

Ich bedanke mich bei PD Dr. med. Martin Busch für seine Unterstützung in methodischer und wissenschaftlicher Hinsicht, für die Begleitung meiner Dissertation, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die Diskussion der experimentellen Fragestellung und seinen Optimismus.

Mein Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Thilo Grune für die Betreuung seitens der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena und für sein Interesse an der Arbeit.

Ich danke Frau PD Dr. rer. nat. Sybille Franke, Frau Katja Schubert und Frau Waltraud Palm für die Einarbeitung, bzw. die Unterstützung in der Durchführung der Experimente.

Für ihre unschätzbare Unterstützung, nicht nur während der Zeit dieser Arbeit, danke ich meinem Freund Rainer Fuß, meinen beiden Eltern Gisbert und Martina Paul, sowie meiner Schwester Anja und ihrem Mann Sebastian Bartossek.

## Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

### **Circulating dendritic cell precursors in chronic kidney disease: a cross-sectional study**

Paul K\*, Kretzschmar D\*, Yilmaz A, Bärthlein B, Titze S, Wolf G, Busch M, *on behalf of the GCKD-Study Investigators*

\* gleichberechtigte Erstautorenschaft

BMC Nephrology 2013, Dec 10; 14: 274

doi: 10.1186/1471-2369-14-274

Submitted: **Vitamin K<sub>1</sub> status and renal function**

Busch M, Stein A, Lehmann G, Paul K, Stein G, Wolf G

Submitted: **Diabetes mellitus and chronic kidney disease – cardiovascular risk profile and treatment strategies in the German Chronic Kidney Disease (GCKD) cohort**

M. Busch, J. Nadal, M. Schmid, K. Paul, S. Titze, S. Hübner, A. Köttgen, U. T. Schultheiss, S. Baid-Agrawal, J. Lorenzen, G. Schlieper, C. Sommerer, V. Krane, R. Hilge, J. T. Kielstein, F. Kronenberg, C. Wanner, K.-U. Eckardt, and G. Wolf, *on behalf of the GCKD Study Investigators*

Abstracts und Poster:

**Decrease in circulating dendritic cell precursors – a new biomarker of cardiovascular disease in chronic kidney disease?**

Paul K, Kretzschmar D, Yilmaz A, Bärthlein B, Titze S, Figulla HR, Wolf g, Busch M, for the GCKD-Study Investigators

*DGfN Hamburg Oktober 2012, ERA EDTA Paris März/April 2012*

**Zirkulierende dendritische Zellen – Mediatoren der Gefäßerkrankung bei chronischer Niereninsuffizienz?**

Paul K, Kretzschmar D, Yilmaz A, Wolf G, Busch M, sowie die GCKD-Studiengruppe  
*DGIM Wiesbaden April 2012, Internistentag Jena November 2011*

**German Chronic Kidney Disease (GCKD) Studie – Nationale Kohortenstudie zu chronischer Nierenerkrankung**

Eckardt KU, Bärthlein B, Baid-Agrawal S, Beck A, Busch M, Eitner F, Ekici AB, Floege J, Gefeller O, Haller H, Hilge R, Hilgers KF, Kielstein JT, Krane V, Köttgen A, Kronenberg F, Oefner P, Prokosch HU, Reis A, Schmid M, Schaeffner E, Schultheiss UT, Seuchter SA, Sitter T, Sommerer C, Walz G, Wanner C, Wolf G, Zeier M, Titze S.

*DGIM Wiesbaden April 2012*

**Chronic kidney disease with and without Diabetes mellitus - differences in cardiovascular risk profile in 5217 patients from the German Chronic Kidney Disease (GCKD) Study**

Busch M, Paul K, Schmid M, Titze S, Hübner S, Bärthlein B, Hilgers KF, Köttgen A, Schultheiß U, Baid-Agrawal S, Lorenzen J, Schlieper G, Sommerer C, Krane V, Hilge R, Kielstein JT, Kronenberg F, Wanner C, Eckardt KU, Wolf G, for the GCKD Study Investigators

*DGfN Berlin September 2014*

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. G. Wolf, PD Dr. med. M. Busch, Prof. Dr. rer. nat. T. Grune,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Daten stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 04.03.2015